

María Jiménez Moreno

**DESARROLLO DE MÉTODOS
ANALÍTICOS PARA ESPECIACIÓN
DE MERCURIO Y SU APLICACIÓN
A LA COMARCA DE ALMADÉN**

I.S.B.N. Ediciones de la UCLM
978-84-8427-669-2



Ediciones de la Universidad
de Castilla-La Mancha

Cuenca, 2009



UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA
Facultad de Ciencias del Medio Ambiente
Departamento de Química Analítica y Tecnología
de Alimentos

DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA
ESPECIACIÓN DE MERCURIO Y SU APLICACIÓN
A LA COMARCA DE ALMADÉN

MARÍA JIMÉNEZ MORENO

TESIS DOCTORAL
Toledo, 2008



Departamento de Química Analítica y Tecnología de Alimentos
Facultad de Ciencias del Medio Ambiente

DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA
ESPECIACIÓN DE MERCURIO Y SU APLICACIÓN
A LA COMARCA DE ALMADÉN

Memoria que para optar al Grado de Doctor en Química
presenta
María Jiménez Moreno

A handwritten signature in blue ink, belonging to Juan José Berzas Nevado, is positioned above the text block.

Fdo. Juan José Berzas Nevado
Catedrático de Universidad del Departamento
de Química Analítica y Tecnología de Alimentos
de la Universidad de Castilla-La Mancha

A handwritten signature in blue ink, belonging to Rosa del Carmen Rodríguez Martín-Doimeadios, is positioned above the text block.

Fdo. Rosa del Carmen Rodríguez Martín-Doimeadios
Profesora Titular del Departamento de Química
Analítica y Tecnología de Alimentos de la
Universidad de Castilla-La Mancha

A handwritten signature in blue ink, belonging to María Jiménez Moreno, is positioned above the text block.

Fdo. María Jiménez Moreno
Licenciada en Química

*Visado en Ciudad Real,
el 28 de marzo de 2008*



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

ANTONIA GARCÍA RUIZ, Profesora Titular de Escuela Universitaria y Secretaria del Departamento de Química Analítica y Tecnología de Alimentos de la Universidad de Castilla-La Mancha,

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de investigación titulado “Desarrollo de métodos analíticos para especiación de mercurio y su aplicación a la Comarca de Almadén” constituye la Tesis Doctoral que presenta **Dña. María Jiménez Moreno** para aspirar al Grado de Doctor en Química, y ha sido realizado en los laboratorios de este Departamento bajo la dirección de los profesores **Dr. D. Juan José Berzas Nevado** y **Dra. Dña. Rosa del Carmen Rodríguez Martín-Doimeadios**

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Ciudad Real a veintiocho de marzo de dos mil ocho.



Fdo. José Antonio Murillo Pulgarín
Director del Departamento

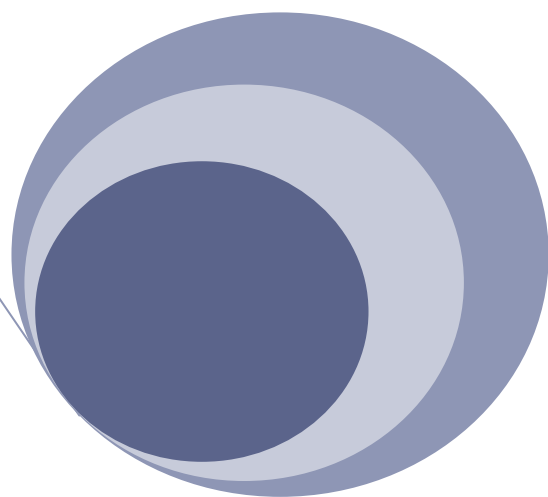
A handwritten signature in blue ink, which appears to read 'Antonia Garcia Ruiz', is written over a faint circular stamp.

Fdo. Antonia García Ruiz
Secretaría del Departamento

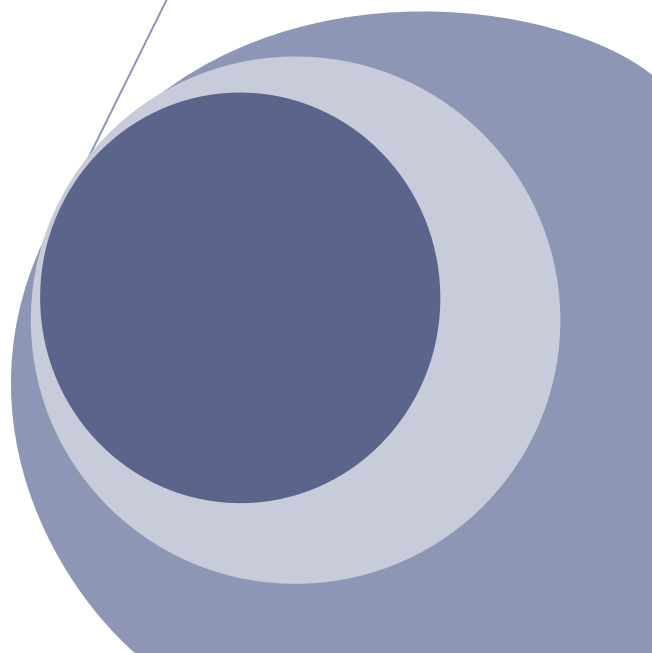
A mis padres

Incluso un camino sinuoso, difícil,
nos puede conducir a la meta
si no lo abandonamos hasta el final

Paulo Coelho, *Maktub*



Índice



ÍNDICE**RESUMEN**

Resumen	3
Abstract	7

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1 El mercurio: Consideraciones generales	13
1.1 Antecedentes históricos	13
1.2 Aplicaciones del mercurio.....	14
1.3 Características físico-químicas.....	16
2 El mercurio en el medio ambiente	19
2.1 Especies presentes en el medio natural.....	19
2.1.1 Atmósfera.....	19
2.1.2 Suelos y sedimentos	20
2.1.3 Aguas	22
2.1.4 Biota	25
2.2 Ciclo biogeoquímico del mercurio.....	26
2.2.1 Procesos de oxidación-reducción.....	28
2.2.2 Procesos de metilación-demetilación	29
2.2.3 Procesos de bioacumulación y biomagnificación del mercurio en la cadena trófica	30
2.3 Fuentes y emisiones de mercurio	33
2.3.1 Fuentes naturales	33
2.3.2 Fuentes antropogénicas.....	35
3 Toxicología del mercurio y sus derivados	38
3.1 Dependencia de la forma química	38

3.1.1 Mercurio elemental	38
3.1.2 Compuestos inorgánicos de mercurio	39
3.1.3 Compuestos orgánicos de mercurio	40
3.2 Fuentes de exposición del hombre al mercurio	42
3.2.1 Exposición ocupacional.....	42
3.2.2 Exposición a través de la dieta	43
3.2.3 Accidentes medioambientales.....	44
4 Análisis de contenidos totales de mercurio	46
4.1 Detección por técnicas atómicas	46
4.1.1 Espectroscopia de absorción y emisión atómica	46
4.1.2 Espectroscopia de fluorescencia atómica	49
4.1.3 Espectrometría de masas con fuentes de plasma	51
4.2 Preparación de muestras para el análisis de mercurio total	52
4.2.1 Pretratamiento de muestras líquidas	53
4.2.2 Pretratamiento de muestras sólidas.....	54
4.2.2.1 Sedimentos	55
4.2.2.2 Muestras biológicas	56
5 Especiación de compuestos de mercurio	57
5.1 Métodos para la especiación de mercurio	59
5.1.1 Extracción de las especies de mercurio	61
5.1.1.1 Extracción ácida	61
5.1.1.2 Extracción alcalina.....	62
5.1.1.3 Volatilización ácida o destilación.....	63
5.1.1.4 Extracción con fluidos supercríticos	63
5.1.2 Preconcentración de las especies de mercurio	64
5.1.2.1 Extracción líquido-líquido.....	64
5.1.2.2 Extracción y microextracción en fase sólida.....	65
5.1.2.3 Atrapamiento	65

5.1.3	Derivatización	66
5.1.4	Separación de las especies de mercurio	69
5.1.4.1	<i>Separaciones no cromatográficas</i>	69
5.1.4.2	<i>Separaciones cromatográficas</i>	70
5.1.5	Detección de las especies de mercurio	72
6	Justificación y planteamiento del estudio	76
7	Bibliografía	79

CAPÍTULO II: INSTRUMENTACIÓN Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

1	Instrumentación	101
2	Limpieza del material	106
3	Toma, tratamiento y conservación de las muestras	107
3.1	Muestras de agua	109
3.2	Muestras de sedimentos	110
3.3	Muestras de bivalvos.....	111
3.4	Muestras de peces	112
4	Reactivos y estándares para análisis de mercurio	113
5	Métodos de análisis químico	116
5.1	Aguas	117
5.1.1	Temperatura y pH	117
5.1.2	Conductividad	117
5.1.3	Sólidos en suspensión y sólidos disueltos.....	117
5.1.4	Carbono orgánico total.....	118
5.1.5	Nitrógeno orgánico	119
5.1.6	Clorofila <i>a</i>	119
5.1.7	Hierro y manganeso	120

5.1.8 Monometilmercurio mediante GC-ICP-MS.....	121
5.2 Sedimentos	123
5.2.1 pH	123
5.2.2 Conductividad	123
5.2.3 Humedad a 105 °C	124
5.2.4 Pérdidas a 500 °C	125
5.2.5 Pérdidas a 900 °C	125
5.2.6 Determinación de la textura	125
5.2.7 Hierro y manganeso	128
6 Métodos estadísticos	129
6.1 Análisis estadístico elemental	129
6.1.1 Parámetros estadísticos descriptivos clásicos.....	130
6.1.2 Procedimiento estadístico para comparar una media experimental con un valor conocido	131
6.1.3 Rectas de calibración.....	131
6.1.4 Comparación de las pendientes de rectas de calibrado...	134
6.1.5 Límites de detección y cuantificación	136
6.2 Contraste de hipótesis: tests estadísticos.....	137
6.3 Diseños experimentales	139
7 Bibliografía	141

CAPÍTULO III: DETERMINACIÓN DE MERCURIO POR FI-CV-AFS

1 Condiciones de medida del sistema FI-CV-AFS	145
2 Determinación de mercurio total por FI-CV-AFS	149
2.1 Determinación de mercurio total en aguas.....	150
2.1.1 Análisis de la fracción particulada	150
2.1.2 Análisis de la fracción disuelta	152

2.2	Determinación de mercurio total en sedimentos	154
2.3	Determinación de mercurio total en muestras biológicas de origen animal	156
2.4	Determinación de mercurio total en plantas de origen acuático...	164
3	Determinación indirecta de mercurio orgánico por FI-CV-AFS	166
3.1	Optimización de la extracción de mercurio inorgánico.....	167
3.2	Validación de las condiciones de extracción seleccionadas.....	173
3.3	Aplicación a muestras reales del método de especiación indirecta de mercurio	174
4	Conclusiones	176
5	Bibliografía	178

CAPÍTULO IV: ESPECIACIÓN DE MERCURIO POR GC-pyro-AFS

1	Desarrollo y optimización de un sistema acoplado de cromatografía de gases y fluorescencia atómica	185
1.1	Adecuación de las formas de mercurio para su análisis mediante cromatografía de gases.....	186
1.2	Optimización del acoplamiento instrumental.....	189
1.2.1	Condiciones cromatográficas.....	190
1.2.2	Adquisición de la señal analítica	192
1.2.3	Temperatura de pirólisis.....	194
1.2.4	Caudal de argón de refuerzo.....	195
1.2.5	Caudal de argón envolvente	196
1.2.6	Condiciones instrumentales seleccionadas	197
1.3	Características analíticas del acoplamiento GC-pyro-AFS.....	198
1.3.1	Límites de detección y cuantificación	198
1.3.2	Rectas de calibrado	200
1.3.3	Aspectos cuantitativos.....	202

2	Especiación de mercurio en muestras biológicas por GC-pyro-AFS	203
2.1	Optimización de las condiciones de extracción y derivatización .	204
2.2	Aplicación a muestras biológicas.....	207
3	Determinación de monometilmercurio en sedimentos mediante GC-pyro-AFS.	211
3.1	Optimización de las condiciones de extracción	214
3.2	Etapas de preconcentración	218
3.3	Etapas de limpieza.....	220
3.3.1	Efecto del mercurio inorgánico: fracción extraíble.....	220
3.3.2	Interferencias cromatográficas	221
3.3.3	Generación artificial de monometilmercurio	222
3.3.4	Optimización de la etapa de limpieza.....	225
3.4	Validación del método con materiales de referencia certificados.	227
4	Conclusiones	232
5	Bibliografía	234

CAPÍTULO V: ESPECIACIÓN SIMULTÁNEA DE MERCURIO Y ESTAÑO POR GC-MS

1	Planteamiento del estudio	241
2	Medida de las relaciones isotópicas por GC-MS	243
2.1	Dilución isotópica y GC-MS.....	243
2.2	Optimización de la medida de las relaciones isotópicas por GC-MS.....	248
2.2.1	Selección de las masas a monitorizar.....	249
2.2.2	Optimización de los parámetros cromatográficos	250
2.2.3	Corrección de la contribución de ^{13}C : Aplicación de ecuaciones de corrección.....	252

2.2.4 Optimización de parámetros del espectrómetro de masas	254
2.2.4.1 Energía de ionización	255
2.2.4.2 Tiempo de integración (dwell time)	257
2.2.5 Condiciones instrumentales seleccionadas	260
3 Metodología para el análisis por GC-MS.	261
3.1 Preparación de las muestras para su análisis por GC-MS	262
3.1.1 Adición de las especies enriquecidas isotópicamente	263
3.1.2 Extracción de las especies organometálicas.....	263
3.1.3 Derivatización de los extractos	264
3.1.4 Análisis de muestras de agua	266
3.2 Validación de la metodología desarrollada	267
3.2.1 Determinación de especies de mercurio o estaño	268
3.2.2 Determinación simultánea de diferentes especies de mercurio y estaño	269
4 Conclusiones	272
5 Bibliografía	273

CAPÍTULO VI: ESPECIACIÓN DE MERCURIO EN LA COMARCA DE ALMADÉN

1 La Comarca de Almadén	279
1.1 Descripción general	279
1.2 Antecedentes bibliográficos relativos a la contaminación por mercurio	282
1.3 Planteamiento del estudio	286
2 Determinación de la contaminación por mercurio	288
2.1 Aguas	291

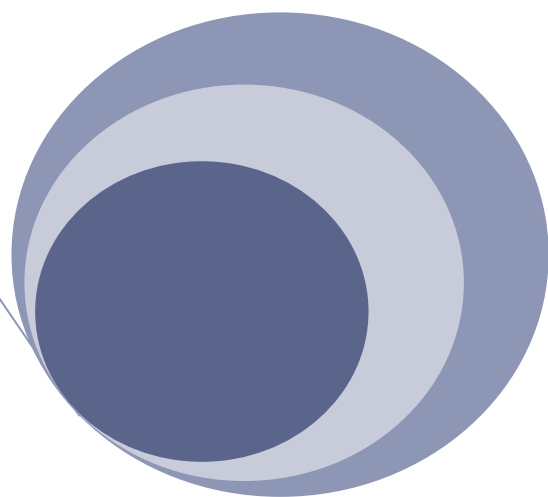
2.1.1	Caracterización hidroquímica	291
2.1.2	Distribución del mercurio entre las fracciones disuelta y particulada y especiación	297
2.1.3	Relaciones entre el mercurio y otros factores medioambientales.....	306
2.2	Sedimentos	313
2.2.1	Caracterización general	313
2.2.2	Contenidos de mercurio total, mercurio extraíble y monometilmercurio	316
2.2.3	Relaciones entre el mercurio y otros factores medioambientales.....	322
2.3	Biota	329
2.3.1	Especiación de mercurio en peces del río Valdezogues	329
2.3.1.1	<i>Análisis biométrico de los peces</i>	<i>330</i>
2.3.1.2	<i>Contenidos de mercurio.....</i>	<i>332</i>
2.3.1.3	<i>Relaciones entre el mercurio y los parámetros biométricos del pez</i>	<i>334</i>
2.3.1.4	<i>Factores de bioacumulación</i>	<i>338</i>
2.3.2	Especiación de mercurio en bivalvos del embalse de La Serena	340
2.3.2.1	<i>Contenidos de mercurio.....</i>	<i>341</i>
2.3.2.2	<i>Factores de bioacumulación</i>	<i>344</i>
2.4	Interpretación de los resultados obtenidos	346
2.4.1	Interacción entre los distintos compartimentos	346
2.4.2	Evaluación de la contaminación por mercurio en la Comarca de Almadén	348
3	Conclusiones	358
4	Bibliografía	363

CONCLUSIONES FINALES

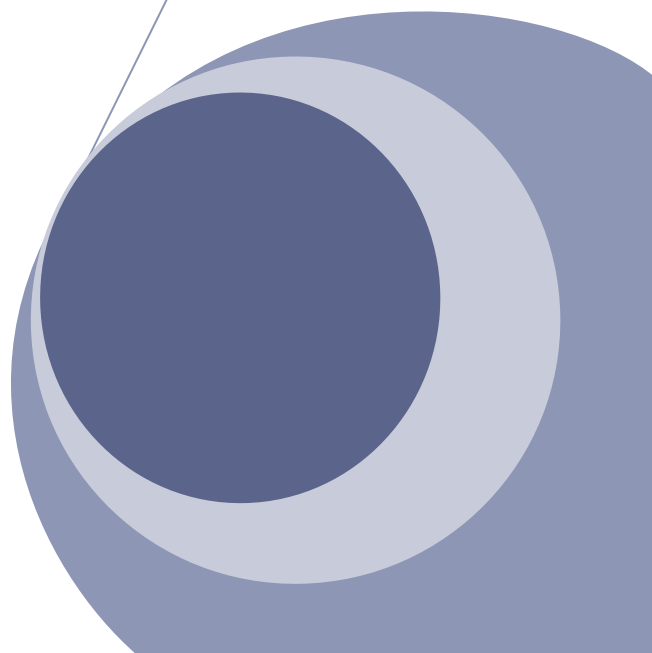
Conclusiones finales.....	377
Final conclusions	381

ANEXO

Publicaciones relacionadas con esta tesis.....	387
--	-----



Resumen



RESUMEN

El mercurio es un elemento cuyo comportamiento en el medio ambiente es particularmente interesante debido a sus posibilidades de volatilización y metilación. Así, el mercurio puede encontrarse en una gran variedad de formas químicas siendo las más tóxicas los compuestos orgánicos, especialmente por su posibilidad de bioacumulación a lo largo de la cadena trófica. Por tanto, para evaluar la contaminación por mercurio no es suficiente la determinación de contenidos totales, sino que se hace necesaria la especiación en niveles de concentración del orden de ultratrazas.

Según todo lo anterior, el principal objetivo de esta tesis ha sido el desarrollo de métodos analíticos fiables y seguros para la especiación de mercurio aplicables a diferentes tipos de muestras medioambientales. Sin embargo, en primer lugar, es necesario conocer los contenidos totales para seleccionar la estrategia de especiación más adecuada. Con este propósito se desarrollaron procedimientos para la determinación de contenidos totales de mercurio en aguas, sedimentos y muestras biológicas de origen animal y vegetal mediante detección por fluorescencia atómica y extracción en horno microondas con recipientes cerrados, en los casos en los que fue necesario. Las condiciones de extracción fueron validadas utilizando materiales de referencia certificados. Asimismo se optimizaron las condiciones de la reducción requerida para la utilización del sistema de inyección de flujo, generación de vapor frío y detección por fluorescencia atómica (FI-CV-AFS).

Antes de proceder a la determinación de especies, se consideró interesante desarrollar un procedimiento de especiación indirecta de mercurio utilizando la instrumentación para análisis de mercurio (FI-CV-AFS). Este método, que se aplicó a peces, se basa en el análisis previo de los contenidos totales en mercurio y una posterior determinación específica del mercurio inorgánico presente en estas muestras por fluorescencia atómica, lo que haría posible la determinación indirecta de los contenidos en mercurio orgánico por diferencia respecto a los contenidos totales. De esta manera

sólo se derivarían hacia la determinación específica de compuestos orgánicos aquellas muestras que ofrecieran un resultado positivo en cuanto al contenido de estas especies.

A continuación, se procedió al desarrollo y puesta a punto de un sistema híbrido para estudiar y caracterizar las dos principales especies de mercurio presentes en el medio ambiente: monometilmercurio y mercurio inorgánico. Atendiendo a la bibliografía, la aproximación más interesante para la especiación de mercurio consiste en acoplar una técnica de separación cromatográfica con un detector atómico sensible. Así pues, en base al cumplimiento de los principales requisitos analíticos se consideró que una de las técnicas más adecuadas para llevar a cabo la especiación de mercurio consistía en el acoplamiento de un cromatógrafo de gases con un detector de fluorescencia atómica vía pirólisis térmica (GC-pyro-AFS), a pesar de que esta técnica no ha sido muy explotada hasta el momento. Debido a que las formas estudiadas son iónicas y no pueden analizarse directamente por cromatografía de gases es necesaria una etapa previa de derivatización que se llevó a cabo utilizando como reactivo tetraetilborato de sodio. Por tanto, además de la optimización del acoplamiento instrumental se efectuó la optimización de la etapa de derivatización o adecuación de las especies.

Una vez desarrollado y caracterizado desde el punto de vista analítico el acoplamiento instrumental propuesto, se incidió en el desarrollo y validación de métodos para la especiación de mercurio en diferentes tipos de muestras medioambientales utilizando dicho sistema. Así, en primer lugar, se puso a punto un procedimiento para la especiación de mercurio en muestras biológicas basado en una extracción previa de las muestras por microondas en recipientes cerrados usando hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) como agente extractante. Asimismo se diseñó una estrategia general para la determinación de monometilmercurio en sedimentos con diferente grado de contaminación. Para ello, debido a los bajos niveles de monometilmercurio en presencia de contenidos generalmente altos de mercurio inorgánico, fue necesario incluir etapas de preconcentración y

limpieza, para llegar a límites de detección adecuados así como evitar la generación artificial de monometilmercurio.

Análogamente a los compuestos organomercuriales, los compuestos butilados de estaño, es decir, mono-, di- y tributilestaño desempeñan un importante papel en la contaminación medioambiental, ya que ambos pueden ser natural o antropogénicamente introducidos en el medio ambiente a través de procesos de biometilación o bioacumulación a lo largo de la cadena trófica. Por este motivo, se consideró interesante el desarrollo de métodos analíticos que permitan analizar simultáneamente estos contaminantes. Con este fin se desarrolló una metodología para la determinación simultánea de especies organomercúricas y organoestánnicas por medio del acoplamiento cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), basada en el análisis por dilución isotópica específica.

Una vez optimizados los métodos analíticos sobre materiales de referencia certificados de interés medioambiental, el objetivo final de esta tesis ha sido la aplicación de la metodología desarrollada a muestras reales. En este sentido, la Comarca de Almadén (España) resulta de extraordinario interés si recordamos que sus yacimientos de cinabrio son los más antiguos y de mayor producción del mundo. Por este motivo, se ha estudiado, por primera vez, la especiación y distribución del mercurio en el sistema constituido por el río Valdeazogues y el embalse de La Serena, bajo la influencia de las actividades mineras desarrolladas en Almadén. Para llevar a cabo este estudio de la contaminación por mercurio, durante los años 2005 y 2006 se tomaron muestras de agua, sedimentos y biota en diferentes puntos situados en el río Valdeazogues y el embalse de La Serena. La caracterización del hidrosistema estudiado ha hecho posible evaluar la influencia de diferentes parámetros físico-químicos en la distribución de mercurio. Por tanto, los resultados obtenidos han permitido determinar las tendencias de distribución del mercurio, así como evaluar sus riesgos potenciales.

ABSTRACT

Mercury is an element of undoubted concern from both environmental and health points of view due to its toxicity at trace levels and also because of the possibility of suffering alkylation reactions in the environment. It is well known that organomercuric compounds are more toxic than inorganic forms because of their higher solubility in lipids, which causes bioconcentration in the food chain. It is therefore clear that total mercury determination is not sufficient, and levels of mercury species should be determined in order to evaluate pollution by mercury.

In this way, the first point of this thesis has been the development of reliable analytical methods to perform mercury speciation analysis in environmental and biological samples. However, it is necessary to know previously the total mercury contents in order to choose the most suitable strategy for speciation. With this intention, analytical methods for the determination of total mercury contents in different types of environmental samples such as waters, sediments, plants and biological tissues were optimised using atomic fluorescence as detection system and closed-vessel microwave-assisted extraction, when necessary. The extraction conditions were optimised by the analysis of certified reference materials. Furthermore, the optimisation of the conditions for the reduction reaction with stannous chloride required for the flow injection-cold vapour-atomic fluorescence detection (FI-CV-AFS) has been carried out.

Before mercury species determination, it is of interest to develop an indirect mercury speciation procedure using the FI-CV-AFS system. The proposed two-stage procedure, which was applied to fish samples, consists of a previous analysis of total mercury contents and a subsequent specific determination of inorganic mercury whereas organic mercury is determined by difference. Thus, if the total organomercury concentration found is a cause for concern, then full speciation should be performed.

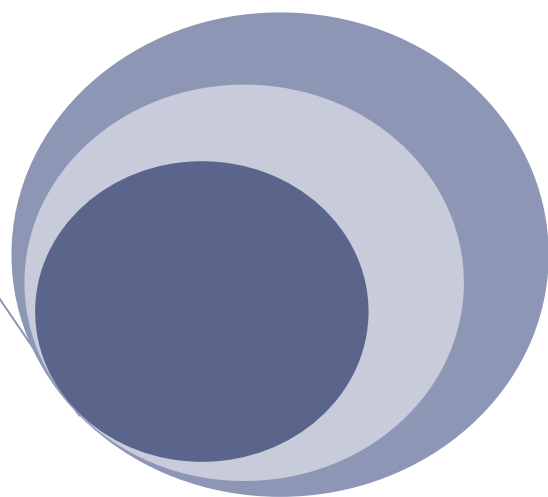
Then, an efficient methodology for the analysis of mercury species was developed. According to the literature, different coupled techniques are possible for mercury speciation. The combination of capillary gas chromatography with atomic fluorescence detection through a home-made pyrolysis unit (GC-pyro-AFS) is an underexploited coupling that features, however, significant advantages such as high sensitivity, high selectivity, low cost and simple operation. Thereby we have chosen this configuration. The multitude of non-interdependent parameters involved in the GC-pyro-AFS required a systematic approach to the optimisation of the system. A derivatization step using sodium tetraethylborate was included to convert mercury species into more suitable forms for its determination by gas chromatography, so this step was also optimised.

Once the instrumental set-up had been optimised, several procedures for mercury speciation in environmental samples were developed. Firstly, a simple and rapid method for speciation analysis of inorganic mercury and monomethylmercury in biological tissues has been carried out. The procedure is based on the quantitative closed-vessel microwave-assisted leaching of mercury from biological samples with an alkaline extractant such as methanolic tetramethylammonium hydroxide. The extracted mercury species were ethylated and analysed by capillary gas chromatography coupled to an atomic fluorescence detector via pyrolysis. Furthermore, a general strategy for real sediment analysis has been developed and validated for both low- and high- polluted sediments, which features very different analytical problems. The procedure was based on closed-vessel microwave extraction, ethylation, and analysis by GC-pyro-AFS. Preconcentration and cleaning procedures have been developed for each type of sediment to detect low concentrations and to control artifact generation by using spiked natural sediments and certified reference materials.

In addition to organomercury compounds, organotin species such as mono-, di- and tributyltin play an important role in the environment due to their possibility of bioaccumulation in the food chain. In this sense, it would be of interest to develop an analytical method to simultaneously analyse

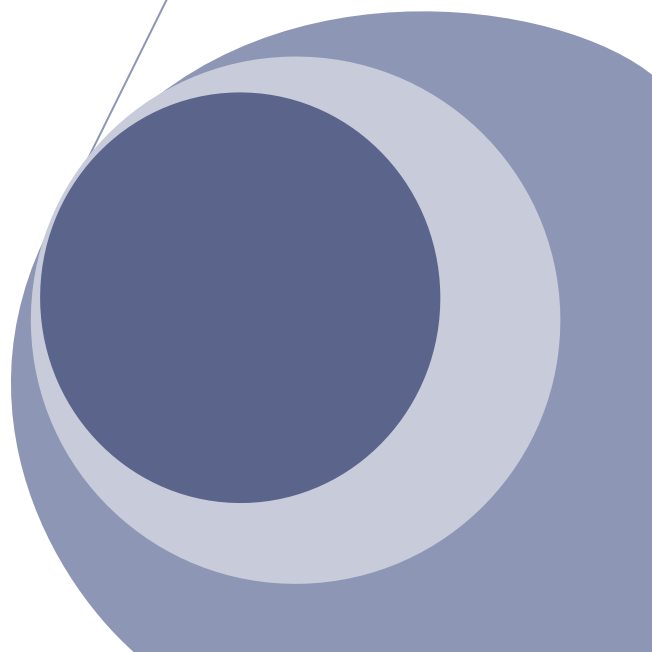
mercury and tin species. Thus, a methodology has been developed for the determination of organomercury and organotin compounds in environmental samples based on the use of species-specific isotope dilution analysis by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) with electron ionization.

Once the analytical methodology for mercury speciation was developed and validated, our objective was the application of these analytical methods to real samples taken from the Almadén area. The speciation analysis of mercury in the Almadén area (Spain) is of extraordinary interest, because its deposits of cinnabar are the most important in the world in terms of mercury mining. Thus, mercury speciation and partitioning have been investigated in the Valdezogues River-La Serena Reservoir system impacted by the Almadén mining activities. Water, sediments and biota were sampled in different seasons during a 2-year study (2005-06) of the Valdezogues River, which runs east to west along the mining district, to La Serena Reservoir. Simultaneously, a comprehensive study was undertaken to determine the influence of some major physico chemical parameters on the fate of mercury within the system. Therefore, the assessment of mercury levels in samples taken from the Almadén mining district will make it possible to determine the distribution trends of mercury, as well as to evaluate its potential risks.



Capítulo I

Introducción



1.- EL MERCURIO: CONSIDERACIONES GENERALES

1.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

El conocimiento y uso, tanto del mercurio como del cinabrio, se remonta a la más lejana antigüedad. En el siglo IV A.C., el mercurio ya era utilizado por Aristóteles en ceremonias religiosas debido a que era un metal apreciado con suma reverencia (1). No obstante, el mineral cinabrio (HgS) se había utilizado durante el paleolítico superior (33000 – 9000 A.C.) como pigmento rojo bermellón en las pinturas rupestres de Altamira y Lascaux. En Egipto se encontró la primera muestra de mercurio líquido en una tumba que data del 1600 A.C., y tanto griegos como romanos utilizaron mercurio para la preparación de cosméticos, medicamentos y para amalgamación. Además en esta época el mercurio era también conocido en China y la India (1, 2). La utilización del mercurio continuó a lo largo de los siglos y durante la Edad Media tuvo una singular trascendencia (1), aunque la verdadera expansión de la industria del mercurio no se produjo hasta 1900.

Su nombre en castellano procede del dios Mercurio (2), aunque también existe la creencia de que esta denominación procede de las estrechas relaciones que en la antigüedad había entre la Metalurgia y la Astrología, lo que determinó que a cada metal se le asignara un cuerpo celeste. Así, al mercurio se le asignó el planeta de su mismo nombre. Estas relaciones también se manifestaron en el florecimiento de la alquimia durante la Edad Media. Diversos fueron los símbolos asignados al mercurio por los alquimistas (*figura 1.1*).



Figura 1.1. Símbolos alquímicos más representativos del mercurio

Para evitar confusiones con idénticos nombres (metal, planeta y dios) los griegos llamaron al metal “Hidrargiro” palabra que significa *plata líquida*, mientras que los romanos latinizaron esta expresión en “Hidrargyrum” que quiere decir *plata viva*. De esta denominación proceden el símbolo químico (Hg) del mercurio y el sustantivo “Hidrargirismo”, intoxicación producida por el vapor de mercurio o por algunos de sus compuestos.

1.2 APLICACIONES DEL MERCURIO

A pesar de que el mercurio y sus compuestos no tienen ninguna función metabólica conocida y que su presencia en los organismos vivos se considera indeseable y potencialmente peligrosa (3), no ocurre lo mismo con sus aplicaciones ya que son variadas y útiles. Las aplicaciones del mercurio además de numerosas son conocidas desde la antigüedad ya que la extracción de cinabrio y su posterior transformación en azogue es una actividad bien conocida desde comienzos de nuestra era. Por tanto, uno de los primeros usos que cabe destacar es su empleo en minería y metalurgia (3-5). Así, el mercurio adquirió trascendencia gracias a su utilización, a partir de mediados del siglo XVI, en los procesos de extracción de oro y plata mediante amalgamación.

Antiguamente se utilizaban bastante algunos compuestos orgánicos de mercurio, tanto en plaguicidas y biocidas como en algunas pinturas, productos farmacéuticos y cosméticos. Aunque muchos de estos usos se han reducido en algunas partes del mundo, los compuestos orgánicos de mercurio siguen utilizándose para diversos fines. Así pues, en algunos países se realizan tratamientos de semillas a base de fenilmercurio que se aplica a los cultivos como fungicida para evitar plagas, el dimetilmercurio se emplea en pequeñas cantidades como patrón de referencia en algunos análisis químicos, y el timerosal (que contiene etilmercurio) se utilizaba desde 1930 como conservador en algunas vacunas y otros productos médicos y cosméticos (4, 6-8).

Tras la revolución industrial el mercurio fue usado extensivamente, además de para la extracción de oro, en la manufactura de sombreros de felpa y de espejos (3). Este uso en el tratamiento de la felpa con la que se fabricaban los sombreros provocó que los usuarios sufrieran problemas neurológicos, hecho que fue reflejado por Lewis Carroll en su libro “Alicia en el país de las maravillas” mediante el personaje de “sombrero-loco”.

Cabe destacar su importante contribución a algunos descubrimientos científicos, ya que su uso en medidas de presión y temperatura fue importante para el descubrimiento de muchas de las primeras leyes físicas y sus especiales propiedades químicas estuvieron implicadas en el descubrimiento de, al menos, 28 elementos. Así, actualmente la mayoría de las aplicaciones del mercurio se fundamentan en sus usos industriales que dependen principalmente del aprovechamiento de algunas de sus propiedades físico-químicas como volumen de expansión, conductividad eléctrica y capacidad para alearse con otros metales.

El mercurio se utiliza como catalizador en la industria cloro-alcalina que produce sosa cáustica y cloro como productos de consumo (4, 8). Ciertos equipos electrónicos y eléctricos como los interruptores o las lámparas fluorescentes y espectrofotómetros UV también usan el mercurio como materia prima (4, 7, 8). En las pinturas, el mercurio puede utilizarse como pigmento en forma de sulfuro de mercurio, y como fungicida para evitar la decoloración provocada por los microorganismos (4, 6-8). Los usos militares tampoco se escapan a este elemento ya que el alto poder detonante del fulminato mercúrico $[\text{Hg}(\text{OCN}_2)_2]$ lo convierte en una materia prima útil en este campo (4, 6-8).

Otros usos del mercurio en la vida cotidiana que siguen rodeados de cierta controversia son su utilización en la aleación por amalgama de los empastes dentales, así como su empleo en la fabricación de termómetros (*figura 1.2*). En cuanto a los empastes dentales, la cantidad residual de mercurio es muy pequeña pero se han documentado ciertos casos de síntomas severos relacionados con estas amalgamas lo que ha llevado a su

prohibición en algunos países (4, 8-10). Por su parte, los termómetros también conllevan un cierto riesgo ya que la rotura de termómetros domésticos y la singularidad de este metal suscitan la curiosidad y aumentan su peligrosidad a pesar de que la cantidad liberada es muy pequeña ($< 0,15$ mL) (4, 6, 9).

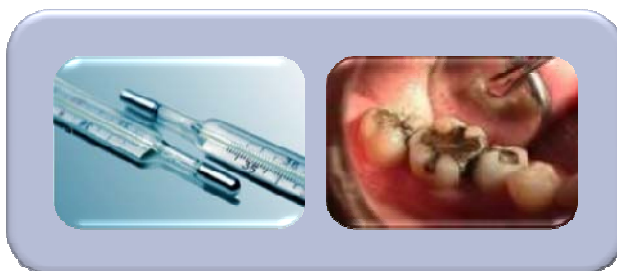


Figura 1.2. Ejemplos de aplicaciones del mercurio en la vida cotidiana

Además de todas las aplicaciones anteriormente mencionadas, otros usos del mercurio son la fabricación de plásticos, instrumentos de medida como barómetros, hidrómetros o pirómetros, cosméticos, cremas y jabones, detergentes, recubrimiento de espejos, así como su utilización en investigación y en santería. Este último uso es importante en algunas zonas donde las creencias milenarias persisten y su empleo religioso, ritual o cultural puede llegar a ser peligroso (3, 4, 6, 9).

1.3 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

El mercurio es un denso metal plateado (su densidad a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ es de $13,5955\text{ g cm}^{-3}$) que, por tanto, se considera un metal pesado. Su símbolo químico es Hg, su número atómico es 80 y su peso atómico es 200,59 u.m.a. Se encuentra en el grupo IIb de la Tabla Periódica junto con cadmio y cinc. Se caracteriza por ser el único metal líquido a temperatura y presión ambiental (*figura 1.3*). Su punto de fusión es el más bajo de todos los metales ($-38,87\text{ }^{\circ}\text{C}$) y su punto de ebullición es de $356,58\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Figura 1.3. Aspecto de una gota de mercurio elemental a temperatura y presión ambiental

El mercurio posee el don de la ubicuidad, de manera que cualquier producto, ya sea natural o artificial, contendrá al menos trazas de mercurio. Esto es debido tanto a su capacidad de amalgamación con otros metales como al resto de propiedades físico-químicas entre las que destacan su bajo calor específico ($138 \text{ J kg}^{-1} \text{ K}^{-1}$), su baja resistividad a la corriente eléctrica ($95,76 \text{ } \mu\text{ohm cm}$ a $20 \text{ } ^\circ\text{C}$), su alta conductividad térmica ($8,34 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$), su alta tensión superficial ($480,3 \text{ din cm}^{-3}$) y su alta presión de vapor ($0,16 \text{ Pa}$), entre otras.

El mercurio puede existir en tres estados de oxidación estables: mercurio elemental [$\text{Hg}^0 / \text{Hg(0)}$], ion mercurioso [$\text{Hg}_2^{2+} / \text{Hg(I)}$] e ion mercúrico [$\text{Hg}^{2+} / \text{Hg(II)}$], siendo sus propiedades muy diferentes dependiendo del estado de oxidación que presente. Además tiene siete isótopos estables (196, 198, 199, 200, 201, 202, 204) y cuatro isótopos radiactivos inestables (194, 195, 197, 203).

Las cuatro especies principales de mercurio más habituales en el medio ambiente son el mercurio elemental (Hg^0), el mercurio inorgánico (Hg^{2+}), el monometilmercurio (CH_3Hg^+) y el dimetilmercurio ($(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$) (11). Estas distintas formas poseen propiedades muy diferentes, como por ejemplo en cuanto a su solubilidad en agua y en lípidos, su volatilidad, etc. lo cual va a determinar su distinta presencia en cada uno de los compartimentos del medio ambiente, así como su toxicidad.

- **Mercurio elemental:** Es raro encontrar esta especie en la naturaleza, exceptuando en la atmósfera donde se encuentra en forma de vapor y es la forma química del mercurio predominante. Su tensión de vapor es muy elevada por lo que incluso se pueden llegar a dar concentraciones peligrosas en el ambiente a ciertas temperaturas. Su solubilidad en agua es muy baja (de 20 a 60 $\mu\text{g L}^{-1}$) pero se disuelve bien en lípidos.
- **Mercurio inorgánico:** A excepción de la atmósfera, lo más común es encontrar el mercurio en la naturaleza formando sales inorgánicas. Algunas de las sales de mercurio más importantes son el cloruro mercurioso (Hg_2Cl_2), también conocido como calomelano o mercurio dulce, con el que se fabrican electrodos de referencia (electrodo de calomelanos) y que ocasionalmente puede ser también utilizado en medicamentos; el fulminato mercúrico [$\text{Hg}(\text{OCN}_2)_2$], un detonador en explosivos, y el sulfuro mercúrico (HgS), pigmento de alto grado para pinturas (6). Esto se explica porque el ion mercúrico (Hg^{2+}) tiene una alta afinidad por muchos ligandos orgánicos e inorgánicos, especialmente por aquellos que contienen azufre. Por tanto, se une fuertemente a grupos sulfhidrilo y, en menor grado, a grupos hidroxilo, carboxilo y fosforilo. De manera que el ion Hg^{2+} tiende a unirse a metalotioneínas, ricas en cisteína (aminoácido no esencial que contiene un grupo sulfhidrilo).
- **Mercurio orgánico:** Los compuestos organomercúricos se caracterizan por la presencia de un enlace C-Hg covalente muy estable, cuya estabilidad parece ser más cinética que termodinámica al deberse a la bajísima afinidad del mercurio por el oxígeno más que a una fuerte energía de enlace. Normalmente el mercurio presente en la naturaleza está unido a uno o dos átomos de carbono por lo que las formas principales son el monometilmercurio y el dimetilmercurio. Estas formas químicas presentan una elevada solubilidad en lípidos y son altamente tóxicas. En cuanto a su solubilidad en agua, el monometilmercurio es soluble en ella, pero no así el dimetilmercurio.

2.- EL MERCURIO EN EL MEDIO AMBIENTE

2.1 ESPECIES PRESENTES EN EL MEDIO NATURAL

El mercurio es un elemento, de origen generalmente mineral, que se caracteriza por su ubicuidad en el medio ambiente. Por lo tanto, se encuentra presente en los diferentes compartimentos medioambientales (atmósfera, geosfera, hidrosfera y biosfera).

2.1.1 ATMÓSFERA

En la atmósfera, el mercurio se encuentra mayoritariamente (>95 %) como vapor metálico en forma de mercurio elemental (Hg^0) (12-14), mientras que el resto aparece en forma de Hg^{2+} tanto unido a partículas en suspensión como, en menor medida, en forma gaseosa. Debido a sus diferencias en cuanto a las propiedades físicas y químicas, las tres formas mayoritarias en las que puede encontrarse el mercurio en la atmósfera, es decir, mercurio elemental (Hg^0), mercurio divalente (Hg^{2+}) y mercurio en fase particulada (Hg_p), presentan un comportamiento atmosférico y unos tiempos de residencia diferentes (15). La lenta oxidación del mercurio elemental hace que su tiempo de residencia en la atmósfera sea de aproximadamente un año, tiempo suficiente para que se distribuya por todo el planeta antes de su deposición en la superficie terrestre. Sin embargo, la forma oxidada del mercurio (Hg^{2+}) se deposita en un tiempo más corto que oscila desde horas a meses a través de deposiciones húmedas (precipitaciones) o secas. No obstante, la escasa fracción de Hg^{2+} que se encuentra en forma gaseosa se deposita por vía húmeda de manera mucho más rápida que el Hg^{2+} unido a partículas (Hg^{2+}_p) (16).

La química atmosférica del mercurio implica diversas interacciones: reacciones en fase gaseosa, reacciones en fase acuosa (en gotas de niebla y nubes y partículas de aerosol deliquescentes), repartición de las especies de mercurio elemental y oxidado entre las fases gaseosa y sólida y, por último, repartición entre las fases sólida y acuosa en el caso de materia particulada insoluble

recogida por las gotas de agua de la niebla o las nubes. La acción recíproca entre los procesos atmosféricos y la química del mercurio se describe en la figura 1.4.

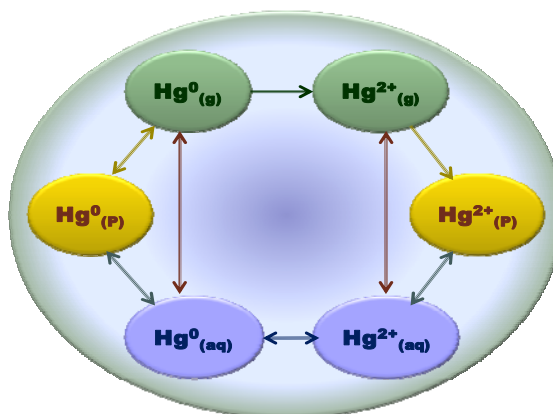


Figura 1.4. Modelo de las interacciones entre las especies de mercurio en la atmósfera (17)

2.1.2 SUELOS Y SEDIMENTOS

Como ya se ha indicado anteriormente, los procesos de re-emisión del mercurio a la atmósfera son importantes y vienen controlados principalmente por la transformación de Hg^{2+} a Hg^0 que tiene lugar en la superficie del suelo por acción de la luz y diversas sustancias húmicas (18).

Una vez depositadas, las especies de mercurio están sujetas a un amplio espectro de reacciones químicas y biológicas. Las condiciones de pH, temperatura y contenidos en sales y componentes orgánicos del suelo favorecen la formación de complejos del ion mercúrico como HgCl_2 , $\text{Hg}(\text{OH})_2$ o complejos orgánicos (4, 19). Este comportamiento complejante controla en gran medida la movilidad del mercurio en el suelo pues aunque los complejos inorgánicos son bastante solubles en agua y, por tanto, de gran movilidad, muchos de ellos tienden a formar nuevos complejos con la materia orgánica (principalmente con los ácidos fúlvicos y húmicos) y

coloides minerales del suelo o sedimentos. Así, gran parte del mercurio que se encuentra en los suelos está unido a la materia orgánica y puede ser lixiviado por la escorrentía sólo cuando se encuentra unido a humus o suelo en suspensión (4). Por este motivo, el mercurio tiene un largo tiempo de permanencia en el suelo y, por lo tanto, el mercurio acumulado en el suelo se sigue liberando a las aguas superficiales y otros medios durante largos períodos de tiempo, posiblemente cientos de años (17). No obstante, se considera que los únicos depósitos de largo plazo para eliminación del mercurio de la biosfera son los sedimentos del fondo del mar donde el mercurio queda físico-químicamente inmovilizado y permanece sin alteración frente a la actividad antropogénica o natural (4).

En suelos y sedimentos son habituales los procesos de metilación-demetilación (*figura 1.5*) ya que el Hg^{2+} , especie predominante en estos dos compartimentos, puede transformarse en CH_3Hg^+ por diversos mecanismos, entre los que destacan los procesos microbianos (20-22).

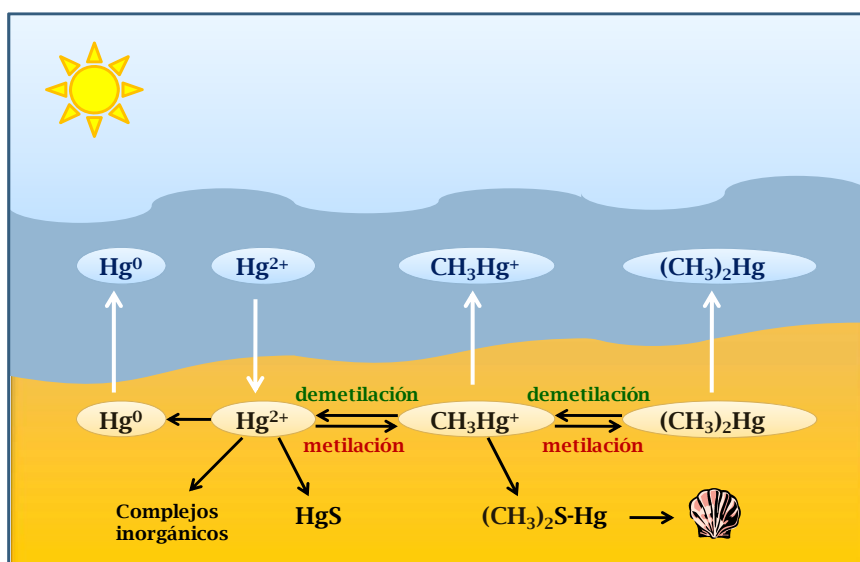


Figura 1.5. Principales transformaciones entre las especies de mercurio en los suelos y sedimentos

Las proporciones y la extensión de la metilación del Hg^{2+} estarán en función de factores como el tipo de compuesto que forma el Hg^{2+} , el agente de metilación, la composición química del sedimento, su concentración de oxígeno o el pH (9, 23). Así, se sabe que niveles elevados de iones cloruro reducen la metilación del mercurio en sedimentos de río mientras que niveles altos de carbono orgánico e iones sulfato aumentan su metilación (20). Además se conoce que la interfase óxica-anóxica (sedimentos superficiales) es la que más facilita la biometilación. No obstante, el contenido en monometilmercurio no suele exceder el 1,5 % del contenido total en mercurio del suelo o sedimento aunque dicha proporción va a depender de las características de los mismos (24). Por otro lado, se considera que el dimetilmercurio es una especie inestable en los sedimentos, aunque puede estabilizarse gracias a una serie de factores como alto contenido en sulfuro, salinidad, condiciones anóxicas y una entrada constante de metano en el medio (25).

Otra de las especies que condicionan la química del mercurio en suelos y sedimentos es el sulfuro de mercurio, ya que parece que los grupos sulfuro podrían ser los responsables de la unión y final preconcentración de las especies de mercurio en los sedimentos. Este compuesto, que es muy insoluble ($K_s=10^{-53} \text{ mol}^2 \text{ L}^{-2}$) y de limitada movilidad, es la principal especie presente en los sedimentos contaminados por mercurio, debido a la reducción del Hg^{2+} por parte de las bacterias sulfato reductoras bajo condiciones anaeróbicas (26).

2.1.3 AGUAS

El mercurio que llega a los medios acuosos naturales lo hace fundamentalmente en forma de sales inorgánicas, siendo únicamente una pequeña fracción la que se introduce directamente en las aguas en forma de metilmercurio a través de las precipitaciones (27). Por tanto, el Hg^{2+} y sus complejos son la forma mayoritaria del mercurio en el agua.

Los niveles de metilmercurio en las aguas son, por tanto, mucho menores que los de mercurio inorgánico debido además a la dificultad de las reacciones de metilación en fase acuosa y a la fácil descomposición por luz UV solar de los compuestos orgánicos de mercurio. Recientes estudios estiman una concentración de mercurio total en las aguas naturales que oscila desde 0,2 a 100 ng L⁻¹, de los que aproximadamente 0,05 ng L⁻¹ serían de metilmercurio lo que representa alrededor del 5 % del mercurio total, porcentaje que aumentaría en áreas fuertemente industrializadas y en áreas acuáticas de intensa metilación de mercurio inorgánico.

No obstante, si las condiciones son favorables, cualquier forma de mercurio que entra en las aguas superficiales puede ser convertida a iones metilmercurio principalmente por metabolismo microbiano (20). Las bacterias reductoras del azufre son las responsables de la mayor parte de la metilación de mercurio, viéndose favorecida su actividad en condiciones anaerobias. Levaduras como *Candida Albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*, cuyo crecimiento está favorecido por condiciones de bajo pH, son capaces también de metilar el mercurio y reducir el mercurio iónico a mercurio elemental. Además, los compuestos de cobalamina metilados producidos por la síntesis bacteriana parecen estar involucrados en la metilación no enzimática de iones inorgánicos de mercurio. Sin embargo, niveles altos de carbono orgánico disuelto (DOC), reducen la metilación de mercurio, posiblemente como resultado de la unión de los iones libres de mercurio con el carbono orgánico disuelto, reduciéndose así su disponibilidad para la metilación. Aparte de que el carbono orgánico disuelto inhibe en cierta medida la metilación bacteriana.

Por lo tanto, todas estas transformaciones que aparecen resumidas en la *figura 1.6* van a depender de diversos factores medioambientales como la actividad microbiana, la temperatura, la disponibilidad de carbono orgánico, la presencia de partículas en suspensión, el oxígeno disuelto y el pH (7, 20, 28, 29).

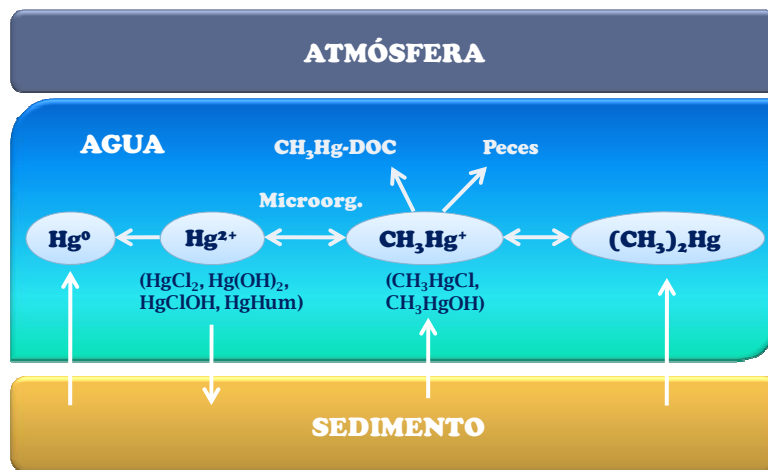


Figura 1.6. Principales transformaciones de las especies de mercurio en el medio acuático (Modificado de (20))

Al igual que en los suelos, la química del mercurio viene determinada por las diferentes variables biológicas, físicas y químicas de las aguas. Así, las condiciones existentes en las aguas superficiales van a hacer diferentes las especies de mercurio presentes en las aguas continentales y en las oceánicas.

En las aguas dulces superficiales de áreas no contaminadas, el mercurio se encuentra en concentraciones de $1 - 20 \text{ ng L}^{-1}$ y se distribuye en mercurio elemental, especies mercúricas y mercurio orgánico (principalmente monometilmercurio, dimetilmercurio y trazas de etilmercurio). La distribución de estas especies entre la fase acuosa, las fases coloidales y las partículas en suspensión varía espacial y temporalmente. Así, en general, la concentración de Hg^0 es mayor cerca de la interfase aire-agua mientras que los niveles de Hg^{2+} y CH_3Hg^+ son más altos cerca de los sedimentos.

En las aguas dulces continentales no contaminadas, el Hg^{2+} no se encuentra como ion libre sino formando complejos con OH^- ($\text{Hg}(\text{OH})^+$, $\text{Hg}(\text{OH})_2$ o $\text{Hg}(\text{OH})_3^-$), mientras que en los estuarios y océanos predominan los clorocomplejos (HgCl^+ , HgClOH , HgCl_2 , HgCl_3^- , HgCl_4^{2-}). En ambientes anóxicos que contengan sulfuro y en un pH de 4-9, el mercurio se combina

formando sulfuro mercúrico. Bajo condiciones ácidas, la actividad del ion sulfuro decrece y de esta forma se inhibe la formación de sulfuro de mercurio favoreciendo la formación de metilmercurio (20). En presencia de sulfuro en disolución, también pueden encontrarse complejos de sulfuro como HgS_2H_2 , HgS_2H^- , HgS_2^{2-} (30).

En términos químicos el monometilmercurio se comporta en el medio acuoso como el mercurio inorgánico y se va a encontrar principalmente unido a partículas y a la materia orgánica disuelta (31). Además en el medio marino se encuentra formando el complejo con cloruro (CH_3HgCl) y en aguas continentales forma el hidroxocomplejo neutro correspondiente (CH_3HgOH) (13). Análogamente, en presencia de sulfuro forma CH_3HgS^- , pero este complejo tendrá una importancia mucho menor que los complejos sulfúricos del mercurio inorgánico.

2.1.4 BIOTA

Un factor muy importante de los efectos del mercurio en el medio ambiente es su capacidad para acumularse en organismos acuáticos y ascender por la cadena alimentaria. De las diferentes formas de mercurio que pueden bioacumularse, el monometilmercurio es una de las que se absorbe y acumula con mayor facilidad.

Existe una clara unanimidad acerca de la importancia que cobran tanto el pescado como el marisco en lo que a problemas de contaminación por mercurio se refiere. Los peces adhieren con fuerza el monometilmercurio y así en el músculo presentan un porcentaje de monometilmercurio frente al mercurio total que supera generalmente el 80 % (3, 7, 21, 32, 33), aunque en otros órganos como el hígado o el riñón la concentración rondaría sólo el 20 %. En otros organismos acuáticos, sin embargo, el porcentaje de metilmercurio es mucho más variable y depende de la profundidad del agua, de la localización y del tipo de organismo.

Como resumen, en la *tabla 1.1* aparecen recogidas las concentraciones medias de mercurio total en distintas matrices medioambientales anteriormente descritas:

Tabla 1.1. *Concentraciones de mercurio total en diferentes tipos de muestras medioambientales (34)*

TIPO DE MUESTRA	CARACTERÍSTICAS	MERCURIO TOTAL
Aire	Medio rural	1 - 10 ng m ⁻³
	Medio urbano	50 - 170 ng m ⁻³
Suelos	No contaminado	< 200 ng g ⁻¹
	Contaminado	0,2 - 100 µg g ⁻¹
Sedimentos	Océano no contaminado	50 - 500 ng g ⁻¹
	Océano contaminado	1 - 100 µg g ⁻¹
	Río contaminado	50 - 200 µg g ⁻¹
Agua	Océano no contaminado	0,5 - 5 ng L ⁻¹
	Río no contaminado	< 5 ng L ⁻¹
	Río contaminado	10 - 200 ng L ⁻¹
	Lagos ricos en ácidos húmicos	1 - 20 ng L ⁻¹
Agua de lluvia	Medio rural	4 - 90 ng L ⁻¹
	Medio urbano	100 - 1000 ng L ⁻¹
Peces	Sin contaminar (río)	0,2 - 1 µg g ⁻¹
	Sin contaminar (océano)	0,01 - 1 µg g ⁻¹
	Contaminados	1 - 10 µg g ⁻¹

2.2 CICLO BIOGEOQUÍMICO DEL MERCURIO

Su dispersión y distribución entre los diferentes compartimentos del medio ambiente, es decir, atmósfera, aguas, suelos y organismos vivos va a depender de diversos factores. Entre ellos se encuentran la acción de los agentes geológicos externos, que causan erosión, y los efectos climáticos y medioambientales. Así pues, al flujo continuo de este elemento que se

produce entre atmósfera, tierra y agua se le conoce como **ciclo del mercurio**, el cual constituye el conjunto de procesos que se esquematiza en la *figura 1.7*.

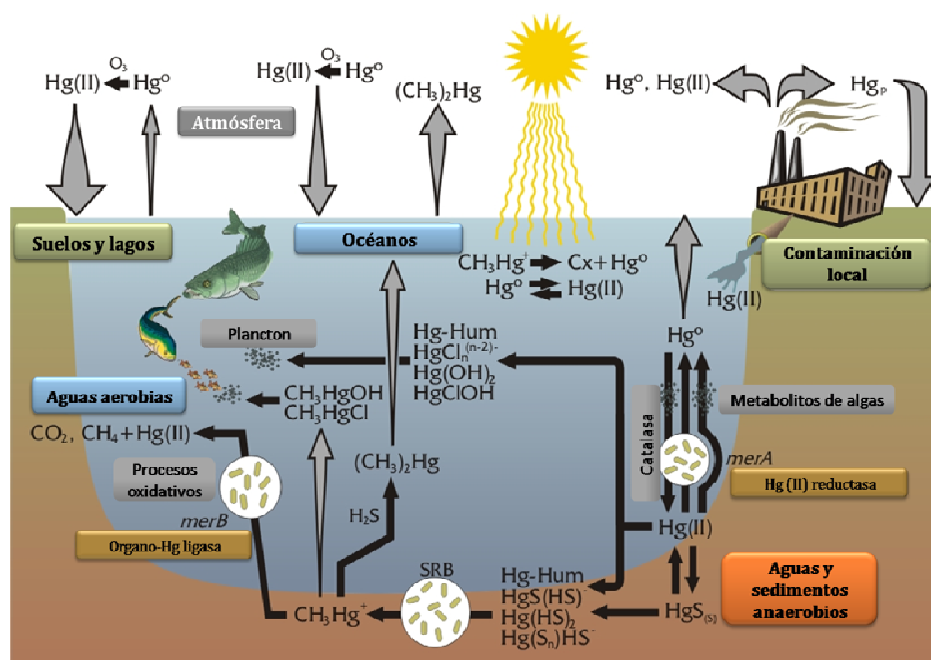


Figura 1.7. Ciclo medioambiental del mercurio (Modificado de (35))

El mercurio inicia su ciclo geoquímico pasando tras su emanación a la corteza terrestre y de ésta pasará al aire, al agua y a los suelos, desde donde llegará a los diferentes organismos vivos, es decir, a plantas, animales y, por último, al hombre por medio de la cadena alimentaria. Posteriormente el mercurio y sus compuestos reinician el ciclo en sentido inverso, en formas: sólidas, disueltas, absorbidas y/o gaseosas. Esto último explica por qué este metal posee algunas propiedades únicas que le permiten tener una gran y fácil movilidad en diferentes medios físicos y químicos.

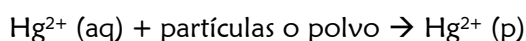
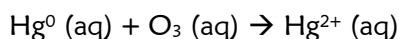
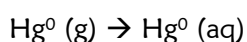
El mercurio y sus compuestos, una vez introducidos en el medio ambiente, pueden experimentar múltiples transformaciones debido a la gran variedad de formas en que puede encontrarse (*figura 1.7*). Pero, en general,

se puede observar un comportamiento muy diferente del mercurio en los ecosistemas terrestres y acuáticos. A diferencia de los suelos, en los que el mercurio se encuentra fuertemente retenido y únicamente es capaz de volatilizarse, en los ecosistemas acuáticos pueden ocurrir procesos de transformación y bioacumulación del mercurio (36, 37).

Entre los procesos, anteriormente mencionados, que puede experimentar el mercurio en su ciclo geoquímico cabe destacar los que se citan a continuación:

2.2.1 PROCESOS DE OXIDACIÓN-REDUCCIÓN

Las reacciones de transformación de las especies de mercurio presentes en la atmósfera rigen, de un modo general, la distribución y deposición del mercurio. El principal mecanismo de transformación entre las especies es la oxidación del mercurio elemental por el ozono (O_3), que ocurre mayoritariamente en las gotas de agua de las nubes (38):



En la atmósfera también se dan, pero en menor extensión, otros mecanismos de oxidación-reducción del mercurio por radicales como OH , HO_2 , H_2O_2 , NO_3 , $HOCl/OCl^-$ (39).

La reducción del Hg^{2+} está considerada como la principal fuente de Hg^0 tanto en las aguas marinas (40) como en las aguas superficiales donde la reducción del Hg^{2+} es el proceso más intenso (41). Hay dos vías diferentes de producción de Hg^0 : biótica y abiótica. La reducción abiótica del mercurio inorgánico a mercurio elemental en los sistemas acuáticos ocurre en presencia de sustancias húmicas solubles ya que las aguas ácidas contienen ácidos húmicos y fúlvicos (42). Sin embargo, la reducción biótica tiene lugar en las

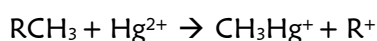
células con la participación de genes del operón *mer* como el *mer A* que codifica la enzima mercurio reductasa (43, 44).

Este proceso de reducción se potencia con la luz, ocurre bajo condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas y es inhibido por competición con los iones de cloro. De esta forma, numerosos parámetros químicos del agua (temperatura, pH, aireación, calcio, dureza total, conductividad) pueden utilizarse como covariables para explicar la bioacumulación de mercurio a través de la cadena trófica (20, 28, 45).

2.2.2 PROCESOS DE METILACIÓN-DEMETILACIÓN

La forma orgánica de mercurio más extendida en el medio ambiente es el monometilmercurio (CH_3Hg^+). Por lo tanto, la metilación del mercurio en las aguas naturales y los sedimentos es otro de los procesos clave en el ciclo global del mercurio (46).

Una gran parte del CH_3Hg^+ que se produce en el medio acuático se forma mediante la metilación directa producida por el fitoplancton (27) y por las algas (48). De manera secundaria, las raíces de las plantas acuáticas son consideradas también como un importante punto de metilación. La reacción general de estos procesos de metilación sería la siguiente:



Sin embargo, en ciertas condiciones, en los ambientes acuáticos también se puede observar la formación de $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ que, al ser volátil, pasará a la atmósfera. Pueden observarse altas concentraciones de $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ en los sedimentos ricos en sulfuros, por dismutación del CH_3Hg^+ (49) o de formas organometálicas por transmetilación (42). En océanos y mares, el $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ se puede encontrar en las aguas poco oxigenadas debido a la gran actividad microbiana. Sin embargo, las concentraciones de $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ son débiles en las aguas superficiales porque en este medio se volatiliza o descompone fácilmente.

Las reacciones de metilación pueden tener lugar por mecanismos bióticos o abióticos aunque, como se ven favorecidas por la ausencia de oxígeno, ocurren preferentemente en condiciones anaerobias y por procesos bióticos. Uno de los principales agentes capaces de metilar el mercurio inorgánico por vía abiótica es la metilcobalamina (50), aunque también pueden llevar a cabo reacciones de metilación algunos aminoácidos o ácidos húmicos o fúlvicos en altas concentraciones. Por su parte, las bacterias sulfato-reductoras son los principales agentes bióticos de metilación, siendo capaces de actuar en una gran variedad de medios acuáticos diferentes.

En algunos ambientes, aparte de las reacciones de metilación, también pueden producirse *reacciones de etilación* que generan concentraciones importantes de etilmercurio ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$). En los sedimentos, la etilación natural del Hg^{2+} puede ser explicada por una transferencia de un grupo etilo sobre el Hg^{2+} , por transetilación llevada a cabo por compuestos etilados de plomo (51), o por alquilación con etileno (50).

La incorporación de grupos metilo sobre el Hg^{2+} en los procesos de metilación puede revertirse por medio de la *demetilación* que es un proceso generalmente aerobio. No obstante, la demetilación puede ser abiótica por fotodegradación del CH_3Hg^+ o llevarse a cabo por vía biótica, la cual dependerá de la acción de diversas comunidades bacterianas y de la enzima organomercurio ligasa codificada por el gen *mer B* (44, 52-54).

2.2.3 PROCESOS DE BIOACUMULACIÓN Y BIOMAGNIFICACIÓN DEL MERCURIO EN LA CADENA TRÓFICA

El término *bioacumulación* hace referencia a la acumulación neta en un organismo de una sustancia química proveniente de fuentes bióticas (otros organismos) o abióticas (suelo, aire y agua) (4, 55).

Sin embargo, la *biomagnificación* consiste en la acumulación progresiva de ciertos metales pesados y otras sustancias persistentes de un

nivel trófico a otro sucesivo. Este proceso está relacionado con el coeficiente de concentración en los tejidos de un organismo depredador en comparación con el de su presa. No obstante, esta relación con la alimentación es muy discutida puesto que en ocasiones se considera que la biomagnificación es el incremento de la concentración de un xenobiótico entre los niveles tróficos, sin discutir el origen de esa adquisición (alimento, suelo, aire, agua, etc.) (4, 55, 56).

En este ámbito existe también otro término que relaciona los dos anteriores, como es el de *bioconcentración* que se refiere a la adquisición de una sustancia por un organismo directamente del ambiente abiótico, resultando en una mayor concentración que el organismo. De esta manera, la bioconcentración se podría definir como un tipo de bioacumulación que está relacionada únicamente con los factores abióticos de acumulación (55).

La bioacumulación del mercurio se produce principalmente a través de las cadenas tróficas acuáticas como se refleja en la *figura 1.8*. Las concentraciones de especies mercuriales en aguas naturales no son tóxicas para el fitoplancton, aunque éste sea capaz de asimilar por difusión pasiva las formas químicas neutras disueltas de Hg^{2+} y CH_3Hg^+ (57). Sin embargo, la toxicidad del mercurio pasa a ser un problema real para los organismos acuáticos superiores que pueden también acumular mercurio por difusión y, principalmente, por ingestión de alimentos contaminados (58). Por lo tanto, una vez que los compuestos orgánicos de mercurio, principalmente el monometilmercurio, han llegado al ambiente acuático, van a acumularse en los seres vivos al ser bioaccesibles por su carácter lipofílico y se van a biomagnificar en la cadena trófica acuática, por lo que los peces de los niveles tróficos más altos tienen normalmente concentraciones de mercurio millones de veces mayores que el agua en el que viven (*figura 1.8*) (9, 59). De esta manera el consumo tanto de pescado como de marisco contaminado es la ruta principal de exposición humana al mercurio orgánico, en general, y al monometilmercurio en particular (3, 4, 6, 9, 29, 32, 33, 60-62).

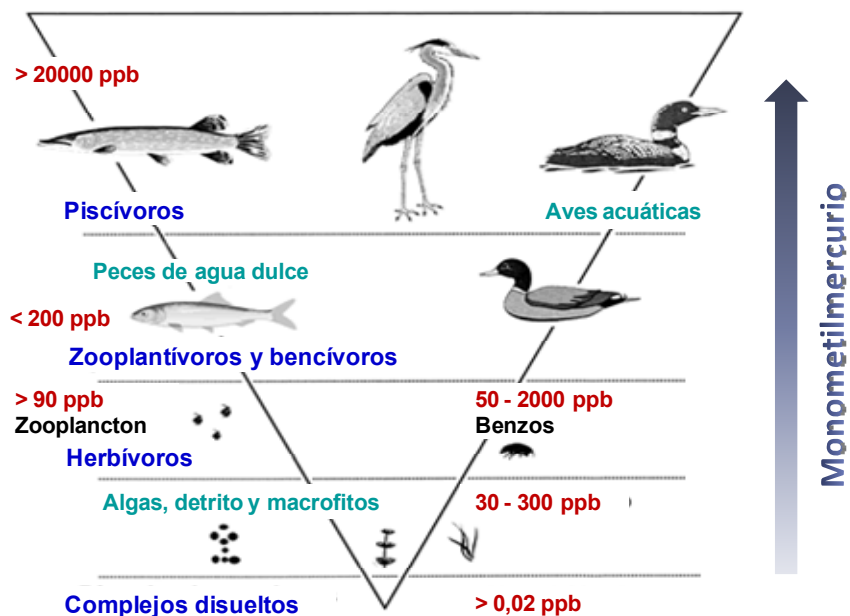


Figura 1.8. Bioacumulación y biomagnificación del mercurio a través de la cadena trófica acuática (Modificado de (63))

A pesar de que tanto el mercurio orgánico como el inorgánico tienden a ser acumulados en la biota, en la cadena trófica se comprueba que existe una mayor acumulación de CH_3Hg^+ que de Hg^{2+} . Esto puede ser debido, entre otras causas, a que la velocidad de excreción del Hg^{2+} es mayor (64). Además, la alta afinidad del metilmercurio a los grupos sulfhidrilo y a los lípidos de animales podría explicar su acumulación en organismos vivos, particularmente en el tejido lipídico. Por tanto, en la biota los niveles de metilmercurio son mayores que en las correspondientes aguas debido a este fenómeno acumulativo ya que los animales acuáticos son capaces de tolerar grandes cantidades de mercurio gracias a las metalotioneínas que inactivan el metal por medio de la unión a los átomos de azufre de los residuos de cisteína de éstas (figura 1.9) (5, 7).

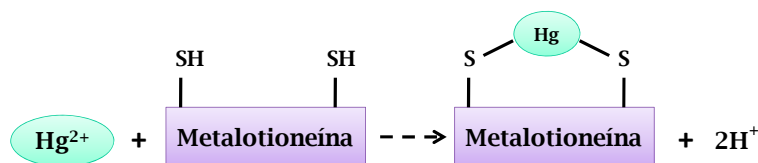


Figura 1.9. Enlace del mercurio a las metalotioneínas a través de los grupos sulfhidrilos

En cuanto a los organismos no acuáticos, podemos decir que los carnívoros están más contaminados por mercurio que los herbívoros (65, 66). Algunos estudios han demostrado que las aves marinas que se alimentan de peces presentan concentraciones de mercurio y metilmercurio relativamente altas, en contraposición a los bajos contenidos encontrados en aquellas aves que no tienen ese tipo de alimentación (24). No obstante, recientemente se ha comprobado que el mercurio también puede pasar a la cadena trófica a través de la vegetación (67).

2.3 FUENTES Y EMISIONES DE MERCURIO

Las fuentes que aportan mercurio al medio ambiente pueden tener origen natural, origen antropogénico o provenir del reciclado de deposiciones previas en reservorios acuáticos y terrestres. La emisión antropogénica de mercurio a la atmósfera suele ser considerada como la fuente más importante, aunque recientes estimaciones indican que los tres orígenes contribuyen a partes iguales a las emisiones totales (17, 68). Este hecho contrasta con las estimaciones realizadas años atrás en las que se observaba una relación aproximadamente de 1/8 entre fuentes antropogénicas/fuentes naturales (69).

2.3.1 FUENTES NATURALES

La importancia del conocimiento de las fuentes y flujos globales de las emisiones naturales de mercurio radica en que este tipo de emisiones no

son controlables y por lo tanto no pueden ser reducidas fácilmente. Las principales fuentes naturales de mercurio son: la desgasificación de la corteza terrestre, las emisiones de vapores de mercurio de los volcanes, la erosión de depósitos minerales, la evaporación del mercurio oceánico y las re-emisiones de la vegetación por los incendios forestales (3, 4, 6, 8, 9, 17).

Las actividades volcánicas son fuentes naturales de mercurio muy importantes, cuya producción es muy superior a la de otras fuentes geotérmicas. Esto es debido a que el mercurio terrestre tiene un origen magmático, sugiriendo algunos investigadores que el mercurio de los yacimientos más importantes, tales como el de Almadén (España), proviene del manto superior. El mercurio proveniente de las actividades tectónicas, como producto de desgasificación a lo largo de fallas profundas, llega en forma elemental a la atmósfera, medio desde el cual se irá dispersando por todo el planeta. Una parte de ese mercurio elemental puede oxidarse por acción de las gotas de ácido sulfúrico que se producen en la atmósfera por enfriamiento de gases contaminantes, depositándose posteriormente en los suelos próximos a las erupciones volcánicas y generándose así una polución local en dichas zonas (70). Las actividades volcánicas o geotérmicas también pueden provocar directamente polución natural por mercurio sobre los océanos y los lagos (71).

Otra destacada fuente natural de mercurio en la atmósfera es la producción de mercurio elemental en las aguas superficiales y los suelos. Lamborg y colaboradores, estimaron la emisión de Hg^0 desde los océanos hacia la atmósfera en 4 Mmol año^{-1} , siendo dicho valor el doble que el encontrado después del comienzo de la era industrial. Mientras que la volatilización natural de mercurio desde los continentes fue estimada, aproximadamente, en 5 Mmol año^{-1} (72).

Por lo tanto, se observa que la mayor parte del mercurio que llega al ambiente lo hace en forma de vapor de mercurio a través de la atmósfera y, una vez en este medio, este mercurio elemental será lentamente oxidado, siendo el tiempo de vida media del mercurio gaseoso elemental de 0,3 a 2

años (73, 74). Las emisiones restantes se producen en forma de mercurio inorgánico, iónico o consolidado en partículas. Estas formas tienen un período de vida más corto en la atmósfera y se pueden depositar en tierras o masas de agua a distancias aproximadas de 100 a 1.000 kilómetros de su fuente (4).

La cuantificación de todas estas emisiones naturales es muy difícil, tanto por tratarse de fuentes dispersas como por las dudas que existen acerca de si algunas de las emisiones que actualmente consideramos como naturales realmente lo son o se tratan en realidad de una re-emisión de mercurio que ha sido movilizada por el hombre. Se han publicado ciertas estimaciones de las emisiones naturales en comparación con las antropogénicas que muestran una gran variabilidad. En general, se subraya la importancia de la contribución humana por lo que las fuentes naturales representarían menos del 50 % de las liberaciones totales. Algunos estudios indican que entre 2.700 y 6.000 toneladas de mercurio elemental son liberadas al año por vías naturales a través de la desgasificación de la corteza terrestre y los océanos (4, 6). Sin embargo, la controversia en este sentido es tal que también pueden encontrarse valores tan dispares como 30.000 toneladas al año (3) o 10.000 toneladas al año (59). No obstante, parece que el valor de unas 3.000 toneladas al año es el más próximo a la realidad (17).

2.3.2 FUENTES ANTROPOGÉNICAS

Las principales fuentes antropogénicas de mercurio pueden clasificarse en tres grupos (4):

- Las liberaciones antropogénicas asociadas con la actividad humana resultantes de la movilización de impurezas de mercurio en materias primas como los combustibles fósiles (especialmente el carbón y en menor medida el gas y el petróleo) y otros minerales extraídos tratados y reciclados.

- Las liberaciones antropogénicas resultantes del uso intencional del mercurio en productos y procesos durante la fabricación, los derrames, la eliminación o incineración de productos agotados y liberaciones de otro tipo.
- La removilización de emisiones pasadas de mercurio antropogénico depositado en suelos, sedimentos, masas de agua, vertederos y acumulaciones de desechos o residuos.

La importancia de cada una de estas fuentes sobre las emisiones es diferente dependiendo de la región (75). Así pues, la incineración es la principal fuente de mercurio en América, Europa occidental y África mientras que la combustión del carbón es la principal fuente en Asia y en los países de la Europa oriental (4, 17). Esto hace que, si bien las emisiones están empezando a disminuir en los países industrializados, en los países en vía de desarrollo sigan aumentando. En España, las fuentes más importantes son la quema de combustibles fósiles, la deposición de residuos sólidos urbanos (RSU) y la industria cementera como se refleja en la *figura 1.10*.

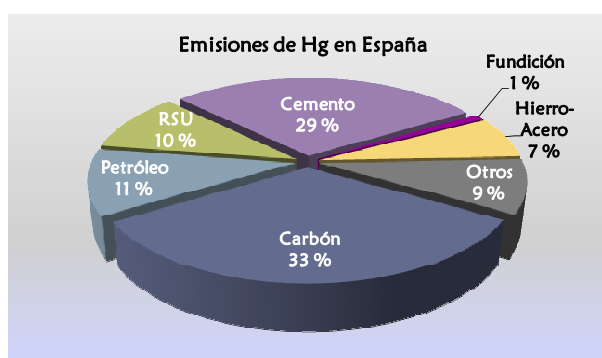


Figura 1.10. Emisiones antropogénicas de mercurio en España según la fuente emisora (17)

Al igual que ocurría con las emisiones naturales, es difícil hacer una estimación del flujo antropogénico hacia la atmósfera. Las publicaciones

hablan de valores muy dispares que van desde unas 1.600-2.000 (17) o 2.000-3.000 toneladas (6) hasta 10.000 toneladas (5). De todos modos, aunque la controversia es evidente, se puede afirmar que la contribución humana es importante y supone alrededor del 30 % del mercurio que hay en la atmósfera (3, 8, 17). Por otro lado, también existen fuentes antropogénicas de mercurio sobre los sistemas acuáticos como son las centrales termoeléctricas, la deposición atmosférica, la industria química y las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR).

Desde la era industrial, los niveles de mercurio no han dejado de aumentar como consecuencia de las emisiones derivadas de la actividad humana, llegando incluso a triplicar. Sin embargo, en los últimos años, la producción de mercurio está disminuyendo debido a las fuertes restricciones que se están comenzando a aplicar. Muchos países europeos están promoviendo su eliminación paulatina en 2010. Para ello se están poniendo en práctica una serie de medidas preventivas en algunos usos o liberaciones de mercurio así como medidas de control que reducen o demoran algunas liberaciones. Estos métodos son aplicables a las emisiones antropogénicas ya que las fuentes naturales están fuera del control humano (*figura 1.11*) (4).

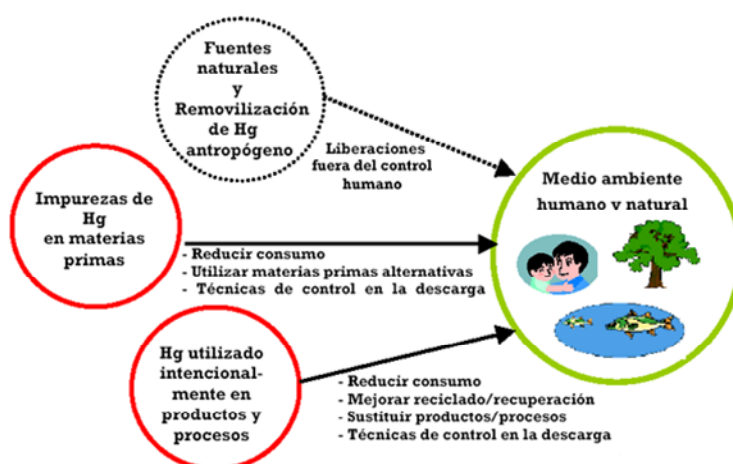


Figura 1.11. Fuentes de liberaciones de mercurio al medio ambiente y principales tipos de posibles mecanismos de control (4)

3.- TOXICOLOGÍA DEL MERCURIO Y SUS DERIVADOS

3.1 DEPENDENCIA DE LA FORMA QUÍMICA

El significado biológico del mercurio se limita a su toxicidad, ya que no se han encontrado evidencias de que sea un elemento esencial para el hombre, flora o fauna. La toxicidad del mercurio depende de su forma química y, por lo tanto, los síntomas y signos varían según la exposición sea al mercurio elemental, a los compuestos inorgánicos o a los compuestos orgánicos de mercurio (en particular los compuestos de alquilmercurio como metilmercurio, etilmercurio y dimetilmercurio). Por tanto, la especiación química es probablemente la variable más importante que influye en la ecotoxicología del mercurio, aunque dicha especiación es complicada especialmente en los medios naturales. Los derivados orgánicos del mercurio y el mercurio vapor se suelen identificar como las especies más tóxicas dado que la permeabilidad de las membranas biológicas es mayor para estas especies. Sin embargo, no se debe generalizar en este campo ya que existen numerosos factores bióticos y abióticos que pueden modificar la toxicidad de los compuestos de mercurio y los mecanismos de acción no se conocen aún en su totalidad (3, 4, 6, 9, 32, 60, 76).

3.1.1 MERCURIO ELEMENTAL

La vía principal de exposición al mercurio elemental es la inhalación de sus vapores. Por esta vía alcanza rápidamente el torrente sanguíneo, distribuyéndose por todos los tejidos, incluido el cerebro (*figura 1.12*). Cerca del 80 % de los vapores inhalados son absorbidos por los tejidos pulmonares mientras que la absorción intestinal de mercurio elemental es muy baja. El mercurio absorbido tiene un período de residencia media de 58 días, aunque en el área del cerebro este período es sólo de 21 días (10). No obstante, el mercurio así absorbido es eliminado en parte a través de la orina y una pequeña parte a través del aire exhalado.

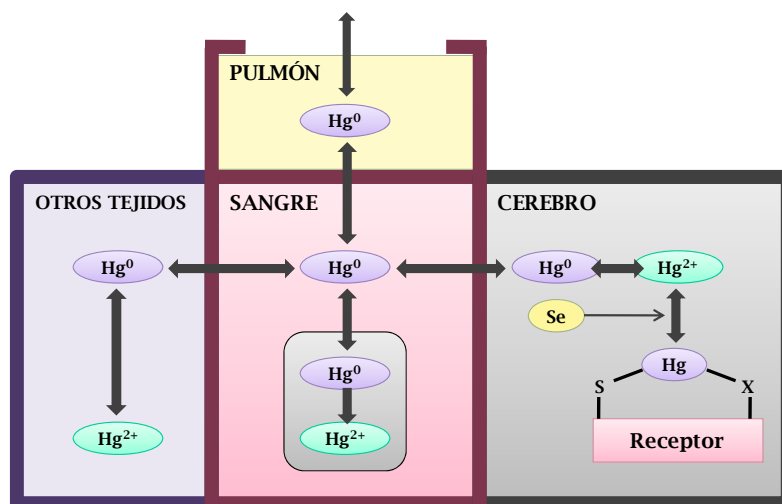


Figura 1.12. Metabolismo del vapor de mercurio inhalado en el cuerpo humano (77)

Debido a su carácter lipofílico el mercurio elemental penetra fácilmente las membranas, incluida la barrera hematoencefálica y la placenta. Sin embargo, en los tejidos es bio-oxidado intracelularmente a mercurio inorgánico, forma en la que atraviesa con mayor dificultad las membranas celulares. Su conversión parcial a HgCl_2 le permite ser retenido por los riñones y el sistema nervioso central (SNC) durante años lo que puede ser un grave problema en los casos de exposición laboral al mercurio (4, 6, 20).

3.1.2 COMPUESTOS INORGÁNICOS DE MERCURIO

El mercurio inorgánico presenta una menor capacidad de difusión a través de las biomembranas que el mercurio elemental debido a su carácter hidrofílico. Así, sólo un 15 % del mercurio asimilado lo hará en forma de mercurio inorgánico. Induce la síntesis de proteínas del tipo metalotioneína en el riñón, si bien la unión principal entre el mercurio y estas proteínas no es estructural y, por tanto, no posee los largos tiempos de vida media que caracterizan a los complejos con otros metales, como el cadmio (2).

La toxicidad de las especies inorgánicas vienen determinadas principalmente por su solubilidad y, por tanto, las especies menos solubles, como el HgS o HgSe , prácticamente no presentan toxicidad mientras que sales de cloruro de mercurio serán las más tóxicas. No obstante, las sales inorgánicas como el HgCl_2 tampoco acceden al cerebro tan eficazmente como lo hacen el metilmercurio o los vapores de mercurio metálico. Tales sales afectan a los riñones y pueden dañar el estómago y los intestinos, produciendo náuseas, diarreas o úlceras severas pero únicamente si estos compuestos son ingeridos en grandes cantidades (20).

Por otro lado, la evaluación general del IARC (International Agency for Research on Cancer) en cuanto a carcinogenicidad concluye que tanto el mercurio metálico como los compuestos inorgánicos de mercurio no son clasificables en cuanto a carcinogenicidad para los seres humanos (grupo 3) (78).

3.1.3 COMPUESTOS ORGÁNICOS DE MERCURIO

Los compuestos organomercuriales son solubles en los lípidos y disolventes orgánicos por lo que son absorbidos de manera más eficaz y atraviesan con mayor facilidad las membranas biológicas que los compuestos inorgánicos, aunque se excretan más despacio (4, 6, 76). Entre los compuestos orgánicos de mercurio, el metilmercurio ocupa un lugar destacado ya que su toxicidad está mejor caracterizada que la de otros compuestos organomercuriales y además gran parte de la población está expuesta a él. No obstante, se considera que los compuestos de alquilmercurio son similares en cuanto a toxicidad, mientras que otros compuestos orgánicos de mercurio, como el fenilmercurio, se asemejan más al mercurio inorgánico en lo que respecta a su carácter tóxico (4).

El metilmercurio atraviesa rápidamente la barrera placentaria y la barrera hematoencefálica y es un neurotóxico que puede afectar muy negativamente el desarrollo del cerebro. Así, la característica más remarcable

de su toxicidad es el daño selectivo que causa al SNC y en menor medida al sistema periférico (79). Además, basándose en su evaluación general de 1993, el IARC considera que los compuestos de metilmercurio pueden ser carcinógenos para los seres humanos (grupo 2B) (78).

Su entrada en el organismo puede darse a través de las vías respiratorias, el tracto gastrointestinal, la piel o las membranas mucosas dado su carácter fuertemente lipofílico. Una vez en la corriente sanguínea el metilmercurio se irá distribuyendo hacia los diferentes órganos como en la *figura 1.13*.

Su carácter lipofílico junto con su difícil eliminación le proporciona la propiedad de bioacumularse. De esta forma, el metilmercurio tiene una vida media de 40-50 días en el interior del cuerpo humano (3, 4, 6, 76, 80). Hay tejidos en los que el metilmercurio se acumula más eficazmente que en otros. El pelo, con concentraciones de 200:1 con respecto a la sangre o el cerebro (20:1) son ejemplos claros (10).

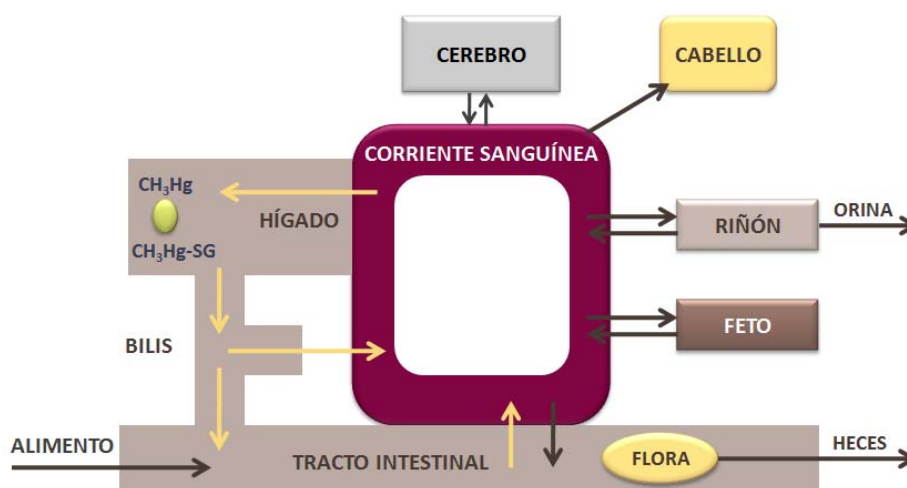


Figura 1.13. Recirculación del metilmercurio en los diferentes tejidos (10)

3.2 FUENTES DE EXPOSICIÓN DEL HOMBRE AL MERCURIO

Las consideraciones acerca del mercurio y su toxicidad han ido cambiando a lo largo de los siglos. Tradicionalmente sólo se daba importancia a los aspectos nocivos para la salud. Así el mercurio se consideraba como un tóxico ocupacional cuya toxicidad se manifestaba principalmente en los trabajadores expuestos a dicho metal. También antiguamente se creía que se podían producir intoxicaciones de mercurio a través de ciertos medicamentos, es decir, que el mercurio era un tóxico iatrogénico (81). Sin embargo, hoy en día, se da más importancia al mercurio en su faceta de contaminante del medio ambiente.

Las intoxicaciones por mercurio pueden producirse a través de diferentes vías (respiratoria o absorción por inhalación, digestiva o absorción por ingestión y cutánea), como ya se ha indicado anteriormente. Así, las principales vías de penetración del mercurio en el hombre serán la inhalación de mercurio metálico por exposición ocupacional o debido a accidentes medioambientales y la ingestión de peces u otros organismos acuáticos que hayan acumulado compuestos organometálicos a través de la dieta. El peligro que representa la exposición por estas vías es muy diferente. Esto se debe a que existen mecanismos de defensa y tolerancia frente al mercurio elemental ya que éste, a ciertos niveles de concentración, forma parte de la composición natural de la atmósfera. Sin embargo, no existen mecanismos de defensa tan efectivos para las formas metiladas, como el metilmercurio.

3.2.1 EXPOSICIÓN OCUPACIONAL

El mercurio que se encuentra en el entorno de trabajo puede ocasionar exposiciones elevadas, siendo la principal ruta de exposición ocupacional la inhalación en fase vapor de las atmósferas de los puestos de trabajo. Dependiendo de los tipos de actividades ocupacionales y la amplitud de las medidas protectoras que se apliquen, la gravedad de los efectos puede variar entre trastornos sutiles, serios perjuicios e incluso la muerte.

Las exposiciones ocupacionales pueden tener lugar en prácticamente todos los ambientes de trabajo en que el mercurio se produzca, forme parte de un proceso o se incorpore en productos. Así, se han señalado casos de exposición ocupacional, entre otros lugares, en plantas de cloro-álcali, minas de mercurio, extracción de oro por medio de mercurio, procesado y venta, fábricas de termómetros, clínicas dentales con prácticas incorrectas de manejo de mercurio y producción de sustancias químicas que contienen mercurio (4, 20).

En muchos países se ha logrado un aumento general de la protección contra la exposición ocupacional en los últimos decenios, gracias a la introducción de una variedad de mejoras, entre ellas sistemas de fabricación más cerrados, mejor ventilación, procedimientos de manipulación seguros, equipos de protección personal y la sustitución de tecnologías a base de mercurio (4). Sin embargo, esa mejora no parece ser aún un logro universal y muchos trabajadores todavía están expuestos a niveles de mercurio que presentan riesgos.

3.2.2 EXPOSICIÓN A TRAVÉS DE LA DIETA

A pesar de que las condiciones ambientales influyen en la exposición al mercurio del hombre, la mayor parte de la población está expuesta al mercurio principalmente por medio de los alimentos. Un factor muy importante en este hecho es la capacidad del mercurio para acumularse en organismos y biomagnificarse al ascender por la cadena trófica. Hasta cierto punto, todas las especies de mercurio pueden llegar a acumularse, pero el metilmercurio se absorbe y acumula más que otras especies.

La Organización Mundial de la Salud estableció que la dieta, especialmente a base de pescados y mariscos, es la fuente de exposición más significativa de metilmercurio (82), como puede verse reflejado en la *tabla 1.2*.

Tabla 1.2. Ingesta media diaria y retención de los compuestos de mercurio por la población general (82, 83)

FUENTE DE EXPOSICIÓN	MERCURIO ELEMENTAL VAPOR	COMPUESTOS DE MERCURIO INORGÁNICO	METILMERCURIO
Aire	0,030 (0,024)	0,0020 (0,0010)	0,008 (0,0069)
Agua potable	Insignificante	0,0500 (0,0035)	Insignificante
Amalgamas dentales	3,8 – 21 (3,0 – 17,0)	Insignificante	Insignificante
Alimentos	Pescado	0,600 (0,042)	2,4 (2,3)
	Otros	3,6 (0,25)	Insignificante
TOTAL	3,9 – 21 (3 - 17)	4,3 (0,3)	2,41 (2,31)

(Estimación de la ingesta diaria en $\mu\text{g día}^{-1}$ por la población no expuesta ocupacionalmente al mercurio. La cantidad estimada retenida en el cuerpo de un adulto aparece entre paréntesis)

3.2.3 ACCIDENTES MEDIOAMBIENTALES

Una cita clave en el estudio del mercurio es el desastre de la bahía de Minamata (Japón) que tuvo lugar a mediados del pasado siglo. Este suceso va a marcar un antes y un después en la historia del mercurio ya que a partir de entonces se empiezan a tener evidencias reales de la problemática asociada a este metal. Entre los años 1920 y 1950, una fábrica química japonesa empleó el mercurio como catalizador para la producción de acetaldehído y cloruro de vinilo, obviándose que esta reacción provocaba la formación de metilmercurio como subproducto del proceso catalítico. Así, cientos de toneladas de metilmercurio fueron liberadas a la Bahía de

Minamata (Japón), compuesto que se concentró en el mar Shirunui, donde por la acción del plancton y otros microorganismos se bioacumuló a lo largo de la cadena trófica (84-86). Los peces, por tanto, acumularon metilmercurio sin sufrir en principio ningún síntoma de toxicidad, pero pronto comenzaron a diagnosticarse misteriosos casos de enfermedades neurológicas lo que desencadenó finalmente en un buen número de muertes (87). Desgraciadamente, no fue hasta el año 1959 cuando se descubrió el origen de este desastre ecológico. Las principales patologías observadas en las víctimas de este episodio de contaminación dieron lugar a una enfermedad del SNC conocida como “*enfermedad de Minamata*” (88). Unos años más tarde (1965), apareció en el delta del río Agano, cerca de Niigata (Japón), un episodio epidémico similar en el que murieron 26 personas de los 47 casos registrados, debido de nuevo a la contaminación de pescado de forma análoga.

Otra importante tragedia con miles de afectados se dio en Irak en 1974. Dicha catástrofe fue ocasionada por la derivación fraudulenta para la fabricación de pan de cereal tratado con fenilmercurio (2, 6, 9, 89). Además en dicho país hubo también problemas por tratar el maíz con fungicidas que contenían mercurio. Casos similares ocurrieron en Ghana con el maíz, en China con el arroz en los años setenta y en Suecia con la contaminación del agua por el uso de pesticidas organomercuriales (6).

Actualmente, existe la creencia de que estamos siendo testigos de un nuevo caso similar al de Minamata en la bahía amazónica debido a la extracción de oro que se está llevando a cabo mediante amalgamas de mercurio ya que el posterior calentamiento de la amalgama para retirar el oro provoca importantes emisiones a la atmósfera (4, 6, 9, 80). Además, existen evidencias claras de contaminación grave en los ríos donde se llevan a cabo estas extracciones, viéndose afectada la fauna piscícola de la zona (23, 56, 90).

4.- ANÁLISIS DE CONTENIDOS TOTALES DE MERCURIO

4.1 DETECCIÓN POR TÉCNICAS ATÓMICAS

Entre las técnicas que se emplean en la determinación de mercurio destacan: la espectroscopia de absorción atómica, la espectroscopia de emisión atómica, la espectroscopia de fluorescencia atómica y la espectrometría de masas con fuentes de plasma.

4.1.1 ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN Y EMISIÓN ATÓMICA

La espectroscopia de absorción atómica (AAS) y de emisión atómica de llama (AES), aún denominada como fotometría de llama, son dos técnicas con múltiples aplicaciones, que permiten determinar un amplio número de metales y no metales en prácticamente todo tipo de muestras, considerando que, para ciertos elementos, pueden alcanzar concentraciones inferiores a los $\mu\text{g L}^{-1}$.

En todas las técnicas atómicas la muestra debe ser, en primer lugar, convertida en vapor atómico mediante un proceso conocido como *atomización*, para que posteriormente esa muestra atomizada sea sometida a la acción de una fuente de excitación con objeto de medir la emisión o absorción que experimenta. En principio, los espectros de absorción son más simples que los de emisión por lo que debería ser preferible basar las medidas en la absorción atómica más que en la emisión de llama. Sin embargo, la matriz en la que se encuentra el elemento puede provocar interferencias, interacciones químicas, una inestabilidad de niveles y de fenómenos anexos que se producen a elevadas temperaturas y que pueden dificultar la medida de la absorbancia. Algunos de estos fenómenos se indican esquemáticamente en la *figura 1.14*.

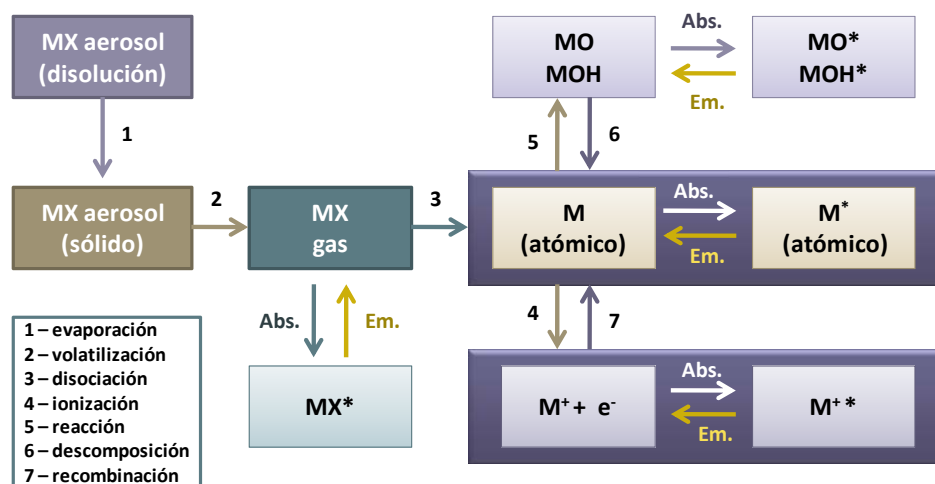


Figura 1.14. Evolución de un aerosol en una llama (91)

Como a temperatura ambiente el mercurio se encuentra en forma de vapor monoatómico su atomización es más simple que la de otros elementos. Por tanto, para su determinación basta con reducir el mercurio inorgánico a mercurio elemental utilizando un reductor, como SnCl_2 o NaBH_4 , para posteriormente a través de un gas inerte arrastrarlo hasta el sistema de medida. Este método conocido como de *vapor frío* o “*cold vapour*” (CV) es el método de análisis de mercurio más extendido ya que no hay pérdidas en la introducción de la muestra, lo que podría ocurrir al utilizar muestras nebulizadas. Tras la generación del vapor frío la detección tiene lugar por absorción atómica utilizando una lámpara de cátodo hueco de mercurio y midiendo a una longitud de onda de 253,7 nm. Por tanto, esta técnica se denomina CV-AAS. Una variante de esta técnica, que también permite el análisis de muestras líquidas o sólidas con una elevada sensibilidad, sería la espectroscopia de absorción atómica con vaporización electrotérmica (ETV-AAS) en la que se trabaja sin llama y la atomización tiene lugar en un tubo o cubeta de grafito calentado eléctricamente.

Las técnicas de emisión atómica con llama también han sido utilizadas en la determinación de mercurio aunque, en general, estas técnicas son

menos sensibles que las de absorción atómica para elementos con líneas de resonancia inferiores a 270 nm. Esto es debido a que las temperaturas de la llama son normalmente insuficientes para lograr excitar a una gran población de átomos al primer estado excitado para que posteriormente pueda producirse la correspondiente emisión. Además, existen otras limitaciones que no han podido ser subsanadas y que hacen que las técnicas de emisión atómica con llama sigan sin ser demasiado utilizadas en este tipo de determinaciones. Entre estas limitaciones se encuentra la perturbación ocasionada por las interferencias espectrales, especialmente en la región del ultravioleta visible donde se observan numerosas bandas moleculares (91).

El empleo de otras fuentes diferentes a la llama como las de arco y chispa eléctricas, pero sobre todo, el plasma han mejorado considerablemente las posibilidades analíticas de la espectrometría de emisión y han ampliado su campo de aplicación, especialmente para la determinación de elementos, como el mercurio, que se encuentran en la parte central de la tabla periódica y poseen espectros de emisión muy ricos en líneas.

El plasma es una mezcla gaseosa conductora de la electricidad que contiene una concentración significativa de cationes y electrones. En el plasma de argón que se emplea en los análisis de emisión, los iones argón y los electrones son las principales especies conductoras. Así, estos iones, una vez formados en el plasma, son capaces de absorber suficiente potencia de una fuente externa, como para mantener un nivel de temperatura en el que la ionización adicional sustenta el plasma indefinidamente.

Las fuentes de plasma ofrecen claras ventajas operacionales sobre otras fuentes de emisión como la llama, el arco o la chispa porque, al poder alcanzar temperaturas muy superiores, tienen capacidad para atomizar e ionizar la mayoría de los elementos, incluido el mercurio. Además las muestras líquidas y gaseosas son introducidas y tratadas con facilidad por el plasma, lo que permite elevados valores de exactitud, sensibilidad y precisión en los análisis para numerosos elementos. Pueden utilizarse tres tipos de

plasma como fuentes de emisión: plasma de corriente continua (DCP), plasma acoplado inductivamente (ICP) y plasma inducido por microondas (MIP) (92). De estas tres fuentes, la de radiofrecuencias o de plasma acoplado inductivamente (ICP) es la que ofrece mayores ventajas en relación con la sensibilidad y la ausencia de interferencias. Esta fuente consiste en tres tubos concéntricos de cuarzo a través de los cuales fluye una corriente de argón. Rodeando la parte superior del tubo de mayor diámetro (aproximadamente 2,5 cm) se encuentra una bobina de inducción refrigerada por agua, alimentada por un generador de radiofrecuencias. La ionización del argón que fluye se inicia por medio de una chispa que proviene de una bobina Tesla. Los iones resultantes y sus electrones asociados interactúan entonces con el campo magnético oscilante que se produce por la bobina de inducción. Esta interacción hace que los iones y los electrones se muevan en trayectorias anulares cerradas (*figura 1.15*) (92).

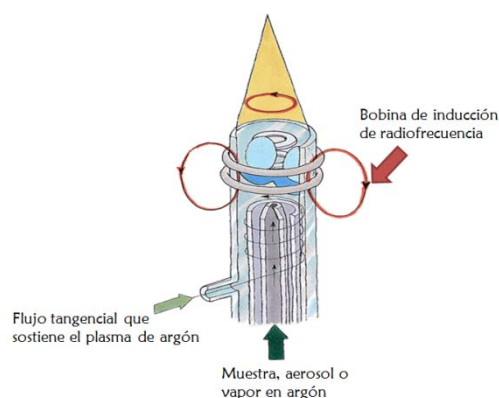


Figura 1.15. Típica fuente de plasma acoplado inductivamente

4.1.2 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA ATÓMICA

La espectroscopia de fluorescencia atómica (AFS) es una técnica de emisión que, a diferencia de la AES, ofrece una gran sensibilidad en la región ultravioleta. Sin embargo, su sensibilidad es mucho menor en la región visible

debido a las intensas interferencias que experimenta en la línea base y a procesos de “quenching” en esta zona espectral (93). Para que pueda producirse el proceso de emisión fluorescente, previamente debe haber tenido lugar un proceso de absorción que implicará dos o más transiciones electrónicas. El proceso emisor fluorescente puede producirse de diversas formas lo que implica que existan distintos tipos de fluorescencia: fluorescencia resonante, fluorescencia sensibilizada, fluorescencia Stokes o anti-Stokes, fluorescencia retardada (94).

Uno de los elementos que se suele estudiar por AFS es precisamente el mercurio ya que este procedimiento es más selectivo y sensible que otras técnicas de espectrometría atómica. Esto se explica por el hecho de que el mercurio absorbe radiación y a continuación produce fluorescencia de resonancia a una longitud de onda de 253,7 nm, de manera que la cantidad de fluorescencia generada va a depender de la intensidad de la radiación incidente. Así pues, aumentando la intensidad de la fuente de radiación puede conseguirse un aumento de la fluorescencia e indirectamente un aumento en la sensibilidad.

Las fuentes de radiación continua o de banda ancha carecen de la suficiente intensidad para su aplicación en AFS. Por ello, como ocurre en el caso del mercurio, se emplean lámparas de descarga de vapor atómico. Un diagrama esquemático de la configuración de un sistema AFS aparece en la *figura 1.16*.

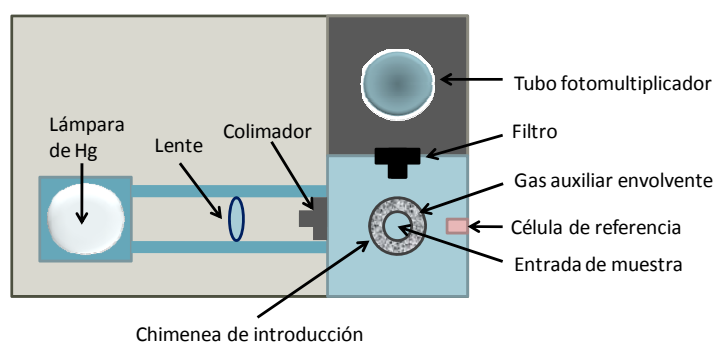


Figura 1.16. Diagrama esquemático de un detector AFS

Para la determinación de mercurio por AFS, la detección suele combinarse con la generación de vapor frío, vapor que suele ser generado de dos formas: químicamente o por pirólisis. Esta técnica fue desarrollada por Hatch y Ott en 1968 (95) y se basa en la reducción del mercurio iónico divalente (Hg^{2+}) hasta su forma metálica (Hg^0) en disolución ácida utilizando un reductor fuerte como borohidruro sódico (NaBH_4) o cloruro estannoso (SnCl_2). En ambos casos los átomos de mercurio que son vaporizados llegarán hasta el detector AFS al ser arrastrados por una corriente de gas, tal y como ocurría en la técnica CV-AAS. Sin embargo, en la fluorescencia es de gran importancia la elección del gas para alcanzar la mayor sensibilidad posible y por este motivo, se suele elegir como gas el argón y no el aire o el nitrógeno que podrían originar procesos de “*quenching*” que harían disminuir la señal.

Las técnicas de determinación de mercurio con AFS previa generación del vapor frío y formación de amalgamas se vienen utilizando extensamente desde hace aproximadamente una década, alcanzándose límites de detección del orden de $0,1 \text{ ng L}^{-1}$.

4.1.3 ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON FUENTES DE PLASMA

El acoplamiento de plasmas ICP y MIP con espectrómetros de masas (MS) ha dado origen a técnicas analíticas mucho más poderosas, muy útiles para la determinación de elementos traza como el mercurio. Con estas técnicas se alcanzan límites de detección similares a los del AFS del orden de pocas partes por trillón (96). No obstante, entre ambas fuentes de plasma el acoplamiento ICP-MS suele ser más empleado para este tipo de determinaciones ya que presenta importantes ventajas.

El ICP-MS se utiliza no sólo por su alta sensibilidad sino también por la reducción en cuanto al tiempo de análisis y la cantidad de muestra, así como por sus capacidades multielementales y multiisotópicas. Además, la detección por ICP-MS nos ofrece una información isotópica adicional y la

posibilidad de realizar diluciones isotópicas estables muy útiles en el análisis de especiación de metales (97).

La técnica de dilución isotópica proporciona una interesante alternativa para tratar de evitar los problemas que pueden darse en las etapas previas de preparación de las muestras en cuanto a transformaciones o pérdidas de las especies a determinar. Esta técnica permite detectar fácilmente las posibles reacciones de interconversión. Además, como el isótopo enriquecido presenta un estado equilibrado y equivalente al isótopo natural, este hecho lo convierte en el patrón interno ideal (98). Por todo ello, la *técnica de espectrometría de masas con dilución isotópica* (IDMS) puede considerarse un método absoluto para el análisis de compuestos organometálicos, como el monometilmercurio, puesto que prácticamente no presenta incertidumbres al corregir ciertas contribuciones que afectan a la exactitud del proceso analítico como bajas recuperaciones, pérdidas de la muestra o las posibles reacciones de interconversión que pueden ocurrir durante el pretratamiento de la muestra (98-101).

4.2 PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS DE MERCURIO TOTAL

Como ya se ha indicado anteriormente, las determinaciones de elementos como el mercurio hacen uso principalmente de las técnicas de espectroscopia atómica. Sin embargo, en la determinación de mercurio la calidad de los resultados va a depender en gran medida de las etapas de pretratamiento de la muestra (102). En general, el tratamiento de la muestra constituye la etapa más larga, laboriosa y crítica para la detección y cuantificación de elementos metálicos a niveles de trazas (103).

Para llevar a cabo determinaciones de mercurio total es frecuente usar la generación de vapor frío de mercurio elemental. Esta técnica requiere que las muestras hayan sido tratadas previamente para asegurar que todo el mercurio se encuentra en su estado de oxidación +2, es decir, en forma de

mercurio inorgánico. Así cuando este mercurio se ponga en contacto con el agente reductor se formará mercurio elemental que es purgado de la disolución en la que se encontraba y transportado al detector. Además de este pretratamiento oxidante, en el caso de que la muestra sea sólida, también será necesaria una etapa previa de extracción.

4.2.1 PRETRATAMIENTO DE MUESTRAS LÍQUIDAS

Para la determinación de mercurio total en aguas naturales es importante distinguir entre la fracción disuelta y la particulada. Por este motivo en primer lugar debe realizarse una filtración de las muestras para, a continuación y de forma independiente, analizar la muestra filtrada (fracción disuelta) y el filtro (fracción particulada). Esta filtración puede realizarse empleando filtros de distintos tipos pero, en todos los casos, éstos han de ser previamente lavados con agua acidificada (HNO_3 al 1 %). Es recomendable que los filtros sean de materiales plásticos como el nylon o el teflón, ya que materiales como las fibras de celulosa podrían disgregarse en la posterior extracción a la que deben ser sometidos los filtros, lo que dificultaría el análisis de la fracción particulada. Además si los filtros fueran hidrofóbicos tendrían que ser previamente activados con el correspondiente disolvente orgánico (acetona, metanol).

Una vez filtradas las aguas, su estudio suele centrarse en la fracción disuelta y por este motivo habitualmente por simplificación se habla de análisis de aguas cuando realmente nos estamos refiriendo al análisis de la fracción disuelta.

Debido a la inestabilidad del mercurio en solución acuosa a bajas concentraciones, las aguas naturales han de ser estabilizadas, preferentemente en el punto de muestreo. Para la adecuada conservación de las muestras, es también necesario acidificarlas en el momento del muestreo con ácido nítrico de alta pureza hasta un $\text{pH} < 2$. Generalmente en la mayoría de los casos basta con añadir de 1-10 mL de ácido nítrico por litro de muestra. Además, tras la toma de las muestras éstas deben trasladarse lo antes posible al

laboratorio en el que serán procesadas y deben conservarse refrigeradas a unos 4 °C.

En el estudio de muestras de agua y efluentes es frecuente tratar la muestra con un agente oxidante como el bromo que se origina “in situ” por oxidación de bromuro antes del análisis. Esta técnica de bromación convierte el Hg(I) y el mercurio orgánico en Hg(II) que es la especie necesaria para evaluar la presencia del mercurio total. Este procedimiento fue propuesto inicialmente por Farey, Nelson y Rolph (104) y constituye en la actualidad un procedimiento estándar. De hecho la bromación se ha utilizado como procedimiento de tratamiento de muestra en la preparación de materiales de referencia certificados, como el CRM 579 (agua de mar), empleado para la validación de métodos de análisis de mercurio en aguas de mar (105). Para eliminar el exceso de bromo generado, que se manifiesta por la aparición de una coloración amarilla en la muestra, se ha de añadir inmediatamente antes de efectuar las medidas, una pequeña cantidad de una solución de ácido L-ascórbico. También puede utilizarse hidrocloreuro de hidroxilamina, a pesar de que este reactivo puede generar nitrógeno gas disuelto que podría provocar una atenuación de la señal medida (106).

Otras matrices líquidas más complejas como los efluentes industriales requieren con frecuencia un tratamiento más intenso con oxidantes más poderosos como el permanganato o el persulfato combinados con mezclas de ácidos, como se indica en el método EPA 7470A (107). Sin embargo, ciertos fluidos biológicos como la sangre, necesitarían de un tratamiento previo similar al que requieren las muestras sólidas, es decir, deberían ser previamente digeridos utilizando la fuente apropiada de calor.

4.2.2 PRETRATAMIENTO DE MUESTRAS SÓLIDAS

Las muestras sólidas pueden también analizarse para determinar su contenido en mercurio total pero para ello deben ser adecuadamente tratadas ya que la mayoría de las técnicas analíticas empleadas para la determinación de contenidos totales requiere que las muestras se encuentren

en estado líquido así como la destrucción de la materia orgánica presente en la muestra. La etapa de pretratamiento debe conseguir extraer el analito de la matriz sólida a la que está unido. Para ello se ha de poner en contacto con un extractante en unas condiciones que debiliten las interacciones “analito-matriz” e incrementen las interacciones “analito-extractante” (103). Generalmente, el análisis de muestras biológicas y de tipo medioambiental se lleva a cabo mediante procesos de mineralización por vía húmeda. En estos casos es frecuente digerir la muestra con ácidos u otros agentes extractantes utilizando fuentes de calor, como un bloque calefactor o un microondas. No obstante, también puede recurrirse a otros métodos tradicionales de extracción o destilación.

4.2.2.1 Sedimentos

Para estudiar el nivel de mercurio en sedimentos no es necesario realizar la destrucción total de la estructura de silicatos, siendo suficiente un tratamiento con ácido que permita extraer el mercurio (108). Por tanto, para la extracción del mercurio total de la matriz sólida, la extracción de los sedimentos suele ser efectuada con ácidos concentrados como HNO_3 (109-111) o mezclas de ácidos (HNO_3/HCl (112-114), $\text{HNO}_3/\text{HCl}/\text{HF}$ (115, 116), $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ (117, 118)). Además algunas veces se añaden también ciertos oxidantes como KMnO_4 , $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ o H_2O_2 (119-121).

Existen diferentes técnicas convencionales de extracción y destilación entre las que se encuentran extracciones manuales o por fluidos supercríticos (122) y destilaciones en vacío (123), con vapor de agua (124) o por corriente de gas (125), que también pueden ser empleadas para la determinación de CH_3Hg^+ . Sin embargo, en los últimos años se está extendiendo el uso de la extracción por microondas debido a que presenta diversas ventajas.

El proceso de extracción con microondas es rápido y fiable, puede automatizarse, necesita cantidades pequeñas de los agentes extractantes y permite una extracción simultánea de las especies mercuriales no volátiles. Además este proceso va a sufrir menos interferencias de la matriz y menos

riesgo de formaciones artificiales de CH_3Hg^+ que los anteriores métodos convencionales de extracción. Su único inconveniente es su falta de selectividad pues ciertos componentes de la matriz sólida pueden extraerse junto a las especies a determinar.

Para la extracción por microondas de sedimentos pueden utilizarse sistemas abiertos (126, 127) o cerrados (128-130). Los sistemas abiertos han sido más extensamente utilizados pero presentan el inconveniente de que pueden producirse pérdidas de los extractantes o de los analitos. Por ello, para tratar de evitar estas pérdidas sería adecuado acoplar al sistema un condensador de reflujo (131). En cuanto a los cerrados en los últimos años están aumentando sus aplicaciones debido a algunas de sus ventajas. Entre ellas se encuentran la posibilidad de poder realizar un control de la presión y temperatura interna de los digestores así como poder controlar y cambiar directamente el proceso de calentamiento. Además en estos sistemas cerrados las pérdidas por volatilización de los analitos son menores.

4.2.2.2 Muestras biológicas

Para la extracción de las distintas formas de mercurio en muestras biológicas generalmente se utilizan los mismos métodos que para los sedimentos. Debido a que la extracción ácida o alcalina a temperatura ambiente (así como los métodos de calefacción convencionales) son generalmente procesos muy lentos, para acelerar la extracción se suelen realizar digestiones por microondas (127, 131) o por ultrasonidos (132).

En el tratamiento de las muestras biológicas mediante microondas se pretende una destrucción eficaz de la materia orgánica, hasta un punto en el que el analito se libere de sus enlaces químicos y dicho contenido orgánico no suponga ninguna interferencia en la cuantificación mediante la técnica de vapor frío. Para ello será necesario, por tanto, realizar una extracción con ácidos fuertes a los que en ocasiones adicionaremos agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno (133, 134), tal y como se indicó para los sedimentos.

En cuanto a la energía del ultrasonidos, éste tiene numerosas aplicaciones en el campo de la química (135) puesto que facilita la lixiviación de los metales en matrices sólidas, mejorando la disgregación de los sólidos y aumentando la eficacia de la extracción. Dentro de los generadores de ultrasonidos, los dispositivos más comúnmente empleados son el baño y la sonda de ultrasonidos, llegando a ser la energía transmitida por la sonda del orden de 100 veces superior a la obtenida por el baño.

5.- ESPECIACIÓN DE COMPUESTOS DE MERCURIO

La forma en que se encuentra un contaminante (en este caso el mercurio) en los sistemas medioambientales o los organismos vivos va a influir de forma significativa en sus propiedades y, en particular, en su toxicidad, movilidad o biodisponibilidad. Además influirá en su acumulación, biomodificación, detoxificación y excreción en los diferentes tejidos y, por tanto, en la biomagnificación que se produce a lo largo de la cadena trófica. Por ello, para evaluar la contaminación por mercurio así como para explicar su actividad biológica en el medio ambiente y/o seres vivos no es suficiente la determinación de contenidos totales, sino que se hace necesaria la especiación en niveles de concentración del orden de ultratrazas.

La especiación o análisis de especies químicas generalmente contempla el estudio de los diferentes estados de oxidación de un elemento (como As, Cr, Se o Fe) o de especies organometálicas individuales (como el ácido metilarsínico, el metilmercurio o el butilestaño). No obstante, la aplicación del término “especiación” va rodeada de cierta controversia y frecuentemente se observan en la bibliografía numerosos errores al hablar de especiación en situaciones en las que realmente no se está realizando, aplicando rigurosamente este término. Según la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), “la especiación química es la identificación y cuantificación de las diferentes especies químicas de un mismo elemento presentes en una muestra o matriz real, de manera que la suma de todas esas

especies debe corresponder al contenido total del elemento en la muestra estudiada“ (136).

Hasta el momento, la mayoría de los estudios de especiación se centra en problemas medioambientales, generalmente en contaminantes de gran incidencia en las últimas décadas como butil- y fenil-estaño o alquil-plomo (137), productos de transformación de elementos tóxicos (metilmercurio o compuestos organoarsenicales) y complejos de elementos esenciales y tóxicos con biomoléculas como selenometionina (138). No obstante, los estudios de especiación están cobrando cada vez más interés en el campo de los alimentos y las ciencias de la salud (*figura 1.17*).

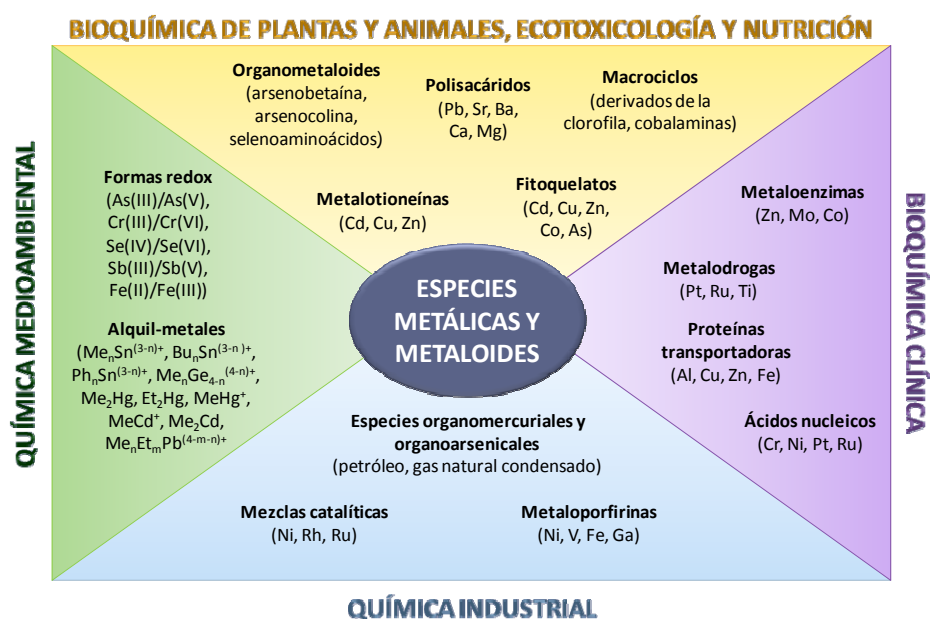


Figura 1.17. Especies y campos de interés en los análisis de especiación (139)

A la hora de desarrollar un método de análisis de especiación es necesario tener en cuenta dos parámetros: la estabilidad termodinámica y la cinética de transformación entre las diversas especies, ya que es de vital importancia que el tiempo de análisis se ajuste al tiempo de vida de la

especie que queremos analizar (140). El mayor problema suele venir dado por la estabilidad cinética, que se encuentra afectada por equilibrios ácido-base, redox y de complejación. En estos casos, pequeños cambios en las condiciones ambientales pueden modificar estos equilibrios físico-químicos existentes, de manera que las especies finalmente determinadas no representan a aquellas que se encontraban originalmente en la muestra.

5.1 MÉTODOS PARA LA ESPECIACIÓN DE MERCURIO

El creciente interés por la especiación elemental ha impulsado el desarrollo de una nueva generación de métodos analíticos suficientemente sensibles y selectivos para permitir la identificación, caracterización y determinación de las distintas formas físico-químicas de mercurio en matrices complejas. Estos métodos deben incluir el menor número de etapas posibles para evitar contaminación, pérdidas y modificaciones de los equilibrios entre las especies presentes.

Por este motivo, para llevar a cabo la especiación de mercurio normalmente se utilizan *métodos híbridos (hyphenated techniques)* que consisten en el acoplamiento de una técnica de separación cromatográfica (o electroforética) con un detector atómico sensible (generalmente un espectrómetro de absorción o emisión atómica o de masas) (*figura 1.18*) (139). Además, para el análisis de muestras sólidas (suelos, sedimentos y muestras biológicas) es necesaria incluir una etapa previa de extracción de la matriz.

Por tanto, los métodos de análisis para determinar las dos especies de mercurio de principal relevancia medioambiental, Hg(II) y CH₃Hg⁺, constan de las siguientes etapas individuales (5, 24, 76, 139):

1. Extracción de las especies de mercurio desde las muestras (suelo, sedimento o biota), que no es necesario en el caso de muestras acuosas.

2. Preconcentración de las especies de mercurio desde el extracto obtenido, para alcanzar niveles de concentración que presenten unos límites de detección accesibles para la técnica de detección seleccionada.
3. Separación de los compuestos (mercurio inorgánico, monometilmercurio), sin variar sus concentraciones relativas originales.
4. Detección individual de cada una de las especies separadas.

Además, dependiendo de la técnica de separación utilizada, puede ser necesaria una etapa adicional de derivatización para convertir las especies de mercurio no volátiles en formas más adecuadas para su posterior separación.

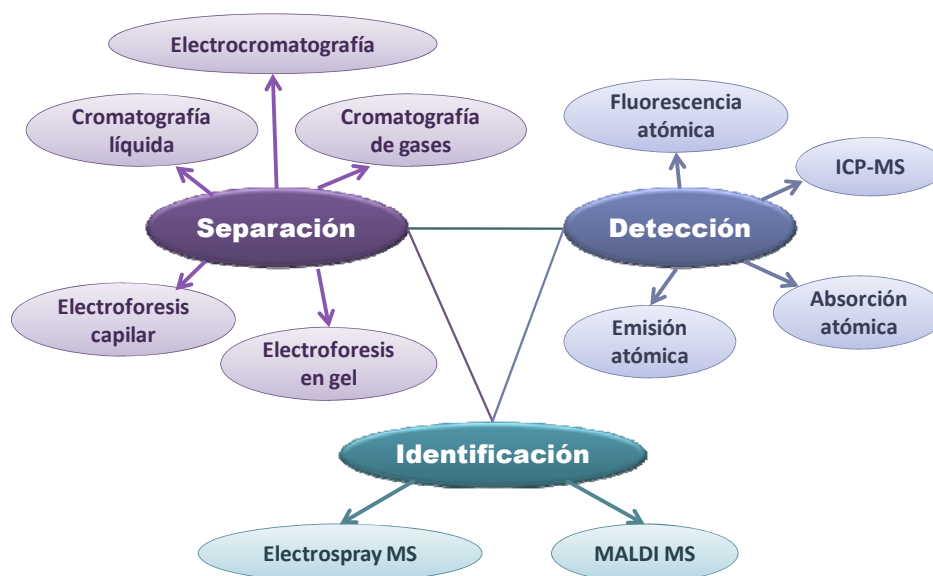


Figura 1.18. Métodos híbridos para los análisis de especiación

5.1.1 EXTRACCIÓN DE LAS ESPECIES DE MERCURIO

La extracción de las especies de mercurio es la etapa crucial de todo el proceso analítico siendo particularmente conflictiva para biota y sedimentos ya que las especies deben extraerse cuantitativamente preservando en todo momento su forma química. Las técnicas de extracción más empleadas en la especiación del mercurio en muestras biológicas y medioambientales pueden ser divididas en los siguientes grupos:

5.1.1.1 Extracción ácida

Es con diferencia la opción más utilizada para la extracción de las especies de mercurio, si bien dentro de este tipo de extracciones podemos distinguir dos tipos de métodos que presentan ciertas diferencias:

➤ Extracción ácida con disolvente (método Westöo)

Westöo desarrolló a finales de los años sesenta un método en el que el CH_3Hg^+ es extraído en forma de CH_3HgCl utilizando ácido clorhídrico y un disolvente orgánico como el benceno, por medio de una extracción que requiere de varias etapas (141). En primer lugar hay que acidificar y añadir el correspondiente disolvente orgánico para extraer en dicha fase el CH_3HgCl . A continuación se realizaría una etapa de “clean-up” en la que la fase orgánica se reextrae de la fase acuosa utilizando cisteína o tiosulfato. Por último, habría que volver a acidificar y a añadir el disolvente orgánico, lográndose que el derivado R-Hg-X que se encuentra en la fase orgánica pueda ser ya directamente analizado por cromatografía de gases y detección por captura electrónica (GC-ECD) o pase a ser derivatizado.

Este procedimiento propuesto por Westöo ha sufrido diversas modificaciones a lo largo del tiempo para la extracción selectiva del metilmercurio. Así pues, en lugar de añadir sólo HCl y disolvente orgánico, se puede utilizar también como medio ácido: $\text{HCl} + \text{NaCl}$ (142); $\text{KBr}/\text{H}_2\text{SO}_4$; $\text{KBr}/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{CuSO}_4$ ó HI (5). Además se pueden emplear otros disolventes

orgánicos diferentes al benceno como tolueno (122, 143, 144), cloroformo (145) o diclorometano (146).

➤ **Digestión ácida**

La digestión ácida sin emplear disolvente permite la extracción simultánea de CH_3Hg^+ y Hg^{2+} . Para acelerar el proceso de extracción se suele realizar la digestión por ultrasonidos o microondas, ya que las fuentes convencionales de calor alargarían el proceso. Los ácidos que suelen ser utilizados como extractantes son ácido nítrico (121, 126) o una combinación de HCl y HNO_3 (127, 147).

A pesar de que tanto en este método de extracción como en el Westöo se realiza una digestión ácida, ambos métodos presentan ciertas diferencias. Entre ellas se encuentra el hecho de que el método de digestión ácida no requiere de un disolvente orgánico para llevar a cabo la extracción y además en el caso de emplear ácido nítrico como extractante, las especies no serían extraídas en forma de derivados clorados, lo cual es característico del método Westöo.

5.1.1.2 Extracción alcalina

La extracción en medio básico encontró sus primeras aplicaciones en el análisis de especies de mercurio en pelo, sangre, peces y tejidos blandos, debido a su capacidad para romper los enlaces proteína-Hg o lípido-Hg (148, 149), aunque en la mayoría de los casos la extracción alcalina es más complicada que la ácida. Dentro de la extracción alcalina destacan tanto la extracción en medio básico fuerte con KOH en metanol (131, 150-153) como en medio básico débil con hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) (127, 131, 134, 154), lo que permite la extracción simultánea de CH_3Hg^+ y Hg^{2+} , al aplicar la correspondiente fuente de calor o energía (ultrasonidos, microondas) para disminuir el tiempo y aumentar el rendimiento de la extracción.

Una vez extraídas las especies, puede llevarse a cabo en esta misma fase el proceso de derivatización, que no siempre es necesario. Antes de realizar la derivatización el procedimiento de digestión alcalina puede combinarse con varias etapas de limpieza entre las que se encuentra la conversión en derivados bromados de las especies, la extracción en disolventes orgánicos y la reextracción con diferentes agentes como tiosulfato o cisteína que permitiría la determinación de las especies por un acoplamiento GC-pirrolizador-AFS sin derivatización.

5.1.1.3 Volatilización ácida o destilación

Otra posible alternativa para permitir la extracción de las especies en un disolvente orgánico sería producir sus correspondientes derivados volátiles. Para ello, la muestra sólida se trata con H_2SO_4 y NaCl o KCl con el objetivo de generar derivados del tipo R-Hg-X , que serían especies volátiles que pueden separarse fácilmente mediante destilación utilizando una corriente de nitrógeno. El compuesto volátil generado se recogería en un tubo cerrado y se mantendría en él hasta su determinación (5).

Esta técnica a pesar de estar ampliamente extendida, ha sido también objeto de críticas por la posible formación artificial de metilmercurio (154-157), ya que tiempos excesivamente largos de destilación pueden facilitar la conversión abiótica del mercurio inorgánico a metilmercurio. El porcentaje de conversión sería muy pequeño respecto al mercurio inorgánico pero, sin embargo, puede suponer un error muy importante en la determinación de metilmercurio debido a los niveles de concentración tan diferentes en los que pueden encontrarse ambas especies en una misma muestra.

5.1.1.4 Extracción con fluidos supercríticos

La aplicación de esta tecnología a la extracción de compuestos de mercurio (122, 158) se encuentra todavía en proceso de optimización, si bien las expectativas puestas en ella son altas. Los reactivos utilizados presentan

ventajas en cuanto a su bajo coste y toxicidad (especialmente el CO_2) y además los tiempos de extracción son razonablemente cortos pues están en torno a una hora. Sin embargo, este tipo de extracción no puede considerarse como un método de rutina en la especiación de mercurio ya que los rendimientos logrados hasta el momento no son suficientemente altos al encontrarse aún entre el 50 y el 70 %.

5.1.2 PRECONCENTRACIÓN DE LAS ESPECIES DE MERCURIO

Las bajas concentraciones de CH_3Hg^+ y Hg^{2+} esperadas en la mayor parte de las muestras medioambientales hacen necesario utilizar en muchos casos etapas de preconcentración, para alcanzar así niveles de concentración detectables por la técnica analítica seleccionada. Dentro de las técnicas de preconcentración empleadas destacan las siguientes:

5.1.2.1 *Extracción líquido-líquido*

Diferentes extracciones líquido-líquido posteriores al tratamiento ácido de algunas muestras medioambientales como sedimentos, aguas o biota se han propuesto como posibles métodos de preconcentración (5). Se recomienda como proceso de limpieza de los extractos la realización de una extracción alterna en las fases acuosa y orgánica, reextrayendo finalmente las especies en la fase orgánica. Westöo propuso una re-extracción mediante la conversión de las especies de mercurio a hidróxido empleando hidróxido amónico saturado con sulfato sódico. Sin embargo, actualmente los reactivos que se utilizan son cisteína o tiosulfato sódico. En el caso de la especiación de metilmercurio, también se ha propuesto el uso de cloroformo junto con agentes complejantes para facilitar su extracción y la adición de HgCl_2 o CuCl_2 para favorecer la liberación del metilmercurio unido a grupos sulfhidrilo (-SH) en muestras sólidas (159).

5.1.2.2 Extracción y microextracción en fase sólida

La preconcentración también podría llevarse a cabo mediante una extracción en fase sólida en la que podrían utilizarse diferentes tipos de adsorbentes sólidos como SCF (fibras de algodón de sulfhidrilo) (160) o resinas de ditiocarbamato (161, 162).

Sin embargo, una de las técnicas más comúnmente utilizadas en la especiación de mercurio y que ha suscitado un gran interés por su posible aplicación a muestras en estado sólido, líquido o gaseoso es la *microextracción en fase sólida* (SPME). Esta técnica consiste en un nuevo sistema que aúna la etapa de muestreo, aislamiento y preconcentración del analito de forma muy sencilla, permitiendo su acoplamiento a una gran variedad de dispositivos instrumentales ya existentes. Su empleo se basa en el establecimiento de un equilibrio de absorción o adsorción de los analitos deseados sobre el recubrimiento de una fibra de sílice fundida (divinilbenceno (DVB), carboxeno (CAR) y polidimetilsiloxano (PDMS), siendo ésta última la más utilizada). Posteriormente, los analitos retenidos en la fibra se desorben, separan y cuantifican con un detector adecuado. La SPME es compatible tanto con la cromatografía de gases como con la de líquidos. Además, la utilización de la SPME como sistema de aislamiento y preconcentración de analitos volátiles minimiza los tiempos de tratamiento de muestra, lo que implica un menor riesgo de pérdida de analitos de interés así como de transformaciones de las especies presentes en la muestra. Por todo ello, en los últimos años se ha empleado extensamente en el análisis de compuestos de mercurio en muestras medioambientales (163-166) y biológicas (153, 167-169).

5.1.2.3 Atrapamiento

Otros exitosos procedimientos de preconcentración serían el atrapamiento criogénico (CT) o el atrapamiento en columna a temperatura ambiente.

El atrapamiento criogénico (CT) permite extraer y preconcentrar los derivados volátiles de los analitos mediante una etapa previa de generación de hidruro o derivatización y su posterior purga con una corriente gaseosa hacia una columna con un relleno análogo al de una columna cromatográfica sumergida en nitrógeno líquido. Posteriormente las especies se desorben y separan en función de sus puntos de ebullición por calentamiento de la columna (121, 127, 147, 170-172) o bien se desorben y separan en una columna cromatográfica adicional situada a la salida del atrapamiento (170). Así, los analitos pueden ser preconcentrados y separados sin necesidad de ningún tipo de disolvente orgánico y pueden llegar a ser analizados por cromatografía de gases a partir de una fase acuosa, lo que minimiza el tiempo empleado en el tratamiento de la muestra.

En cuanto al atrapamiento en columna a temperatura ambiente puede llevarse a cabo utilizando fases sólidas como el Tenax y el Chromosorb en las que los analitos quedan fijados y posteriormente son eluidos de forma súbita consiguiendo de esta manera preconcentrarlos.

5.1.3 DERIVATIZACIÓN

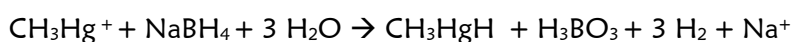
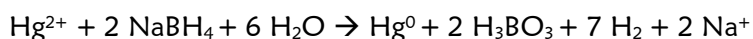
Los compuestos organomercúricos se encuentran generalmente en la matriz de la muestra en forma de especies iónicas. Por este motivo para poder llevar a cabo análisis de especiación de mercurio empleando como técnica de separación la cromatografía gaseosa es necesario que los compuestos de mercurio sean extraídos de la muestra y convertidos a continuación en especies volátiles (173-176).

Una de las técnicas tradicionales de derivatización es la reacción de Grignard, que posibilita el poder elegir entre diferentes grupos alquilo para obtener las correspondientes especies alquiladas, aunque generalmente se realiza la reacción utilizando como magnesiano el cloruro de butilmagnesio (51). Los reactivos de Grignard son muy sensibles frente al agua y, por consiguiente, la extracción previa de las especies organomercuriales ha de

realizarse en disolventes orgánicos (173). Por tanto, el proceso global de preparación de la muestra siguiendo este procedimiento suele ser largo y tedioso y, además, su uso requiere de personal experto para conseguir resultados reproducibles (174).

Para solventar algunos de los inconvenientes que presenta la derivatización por Grignard, otros métodos muy extendidos son la generación de hidruros utilizando borohidruro sódico (NaBH_4) o reacciones de etilación o fenilación utilizando como reactivos el tetraetilborato de sodio ($\text{NaB}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$) o el tetrafenilborato de sodio ($\text{NaB}(\text{C}_6\text{H}_5)_4$), respectivamente.

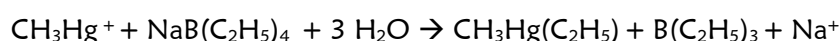
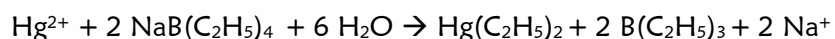
La derivatización por generación de hidruros permite una reducción en el tiempo de reacción y el coste de los análisis, a la vez que mejora la exactitud del método (174, 177). En esta reacción con NaBH_4 se consigue generar especies volátiles de mercurio tras una digestión ácida o alcalina de las muestras. Las reacciones que tienen lugar en este proceso son las siguientes:



De las reacciones anteriores se deduce que uno de los inconvenientes de la generación de hidruros es el exceso de hidrógeno que se forma, así como la inestabilidad de las especies generadas. Esto limita las aplicaciones del procedimiento y de hecho, sólo se han descrito algunas aplicaciones en las que se utiliza atrapamiento criogénico y cromatografía de gases utilizando columnas empaquetadas, pero no se conoce su aplicabilidad a columnas capilares.

Otra forma de llevar a cabo la derivatización sería el empleo de tetraetilborato de sodio ($\text{NaB}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$) generándose las correspondientes especies etiladas lo que constituye el proceso de derivatización “in situ” más

seguido habitualmente. Las reacciones implicadas en este proceso serían las que se indican a continuación:



Frente a la derivatización por Grignard posee la ventaja de que el proceso puede tener lugar en fase acuosa por lo que no será necesario realizar la extracción en un disolvente orgánico. Sin embargo, la utilización de este reactivo presenta también ciertos inconvenientes debido principalmente a la inestabilidad del $\text{NaB}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$ frente a la humedad ambiental. Este tipo de derivatización por etilación suele ser además algo más lenta que la generación de hidruros. No obstante, el principal inconveniente de este procedimiento es la imposibilidad de poder distinguir entre el mercurio inorgánico (Hg^{2+}) y el etilmercurio ($(\text{C}_2\text{H}_5)\text{Hg}^+$), especies que pueden coexistir en determinadas muestras medioambientales (51).

Por tanto, para poder determinar simultáneamente el mercurio inorgánico y el etilmercurio habría que recurrir a la propilación con tetrapropilborato de sodio ($\text{NaB}(\text{C}_3\text{H}_7)_4$). Este tipo de derivatización es más tolerante a las interferencias ocasionadas por los cloruros por lo que puede ser aplicado directamente en la determinación de los bajos niveles de mercurio presentes en aguas (178, 179). Sin embargo, pese a las ventajas que ofrece la propilación en cuanto a la determinación de etilmercurio en muestras medioambientales, dicho proceso presenta el inconveniente de que puede implicar formaciones artificiales tanto de metilmercurio como de etilmercurio durante la derivatización, como ya ha sido comprobado en el análisis de muestras de suelo (180).

Por último, otra alternativa sería el uso del tetrafenilborato de sodio ($\text{NaB}(\text{C}_6\text{H}_5)_4$) como reactivo acuoso de derivatización (160). La fenilación ha sido de momento poco explotada como reacción de derivatización a pesar

de que el $\text{NaB}(\text{C}_6\text{H}_5)_4$ presenta ciertas ventajas frente al $\text{NaB}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$ (160, 181). Entre ellas estaría el hecho de que el $\text{NaB}(\text{C}_6\text{H}_5)_4$ es más estable en agua y puede ser manipulado según procedimientos habituales de laboratorio sin necesidad de un especial cuidado. No obstante, también presenta ciertos inconvenientes ya que, en general, la generación de los derivados fenilados es más lenta que la de las correspondientes especies etiladas y, además, el rendimiento de la reacción de fenilación suele ser inferior al de la reacción de etilación.

5.1.4 SEPARACIÓN DE LAS ESPECIES DE MERCURIO

La separación de los compuestos de mercurio puede llevarse a cabo por procedimientos cromatográficos y no cromatográficos aunque, por lo general, son más poderosas las separaciones cromatográficas. Por este motivo, estas últimas son las técnicas más usuales en el campo de la especiación de mercurio aunque, no obstante, existen algunas aproximaciones no cromatográficas simples que pueden ser utilizadas para separar adecuadamente diferentes especies en una muestra dada (5).

5.1.4.1 Separaciones no cromatográficas

Dentro de las separaciones no cromatográficas destaca la *electroforesis capilar* (CE), aunque esta técnica está mucho menos extendida en el campo de la especiación que las técnicas cromatográficas. La electroforesis capilar se caracteriza por el uso de capilares de diámetros internos muy pequeños. Esto le confiere una elevada eficiencia de separación debido a la elevada movilidad electroforética de las especies cargadas pero, sin embargo, limita su sensibilidad aún realizando un acoplamiento con un detector altamente sensible (182). El empleo de la electroforesis capilar como técnica de separación suele ir asociada a procesos de preconcentración previos (183) o al uso de los detectores más sensibles como el ICP-MS (184, 185).

Otras posibles separaciones no cromatográficas ya han sido descritas anteriormente como métodos para la extracción y/o preconcentración de las especies de mercurio. Así pues, la separación del monometilmercurio puede llevarse a cabo, por ejemplo, por métodos de extracción como el propuesto por Westöo o por destilación e igualmente por preconcentración utilizando adsorbentes como SCF o resinas de ditiocarbamato, ya que estos medios retendrían el CH_3Hg^+ pero no el Hg^{2+} .

No obstante, también han sido propuestos otros métodos de separación no cromatográficos como la utilización de microorganismos como la levadura *Saccharomices cerevisiae* (186) o algunos procedimientos de reducción diferencial que se basan en el hecho de que el Hg^{2+} puede ser reducido directamente a Hg^0 con SnCl_2 mientras que el CH_3Hg^+ no se reduciría en esas condiciones. Para poder reducir el CH_3Hg^+ sería entonces necesario combinar el SnCl_2 con CdCl_2 siguiendo el procedimiento descrito por Magos (187).

5.1.4.2 Separaciones cromatográficas

A pesar de que existen técnicas no cromatográficas capaces de permitir la separación de las diferentes especies contenidas en una muestra, la técnica que ofrece mejores resultados dentro del campo de la especiación consiste en el acoplamiento de una separación cromatográfica con un detector atómico sensible. Dentro de las separaciones cromatográficas podemos hacer una distinción entre la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC):

➤ Cromatografía de gases (GC)

Es la técnica cromatográfica más utilizada de cuantas se aplican a la especiación de mercurio debido a su alto poder de resolución, fácil manejo y facilidad de acoplamiento a un gran número de detectores. La separación de las especies de mercurio presenta el inconveniente de que dichos compuestos

son especies cargadas, no volátiles y térmicamente inestables, todo lo cual se resuelve, como se indicó anteriormente, al realizar una etapa previa de derivatización. Sin embargo, la cromatografía de gases presenta la ventaja de que la sensibilidad es bastante alta ya que la transferencia cuantitativa de analitos de la columna cromatográfica al detector sin necesidad de nebulización incrementa considerablemente los límites de detección.

Existen dos tipos de columnas cromatográficas: las capilares y las empaquetadas. Inicialmente se empleaban columnas empaquetadas que presentaban diversos problemas como la aparición de grandes colas en los picos cromatográficos, una pobre eficiencia de la columna y áreas de picos reducidas (188). Por ello, para tratar de superar estos inconvenientes se ha pasado a utilizar columnas capilares que requieren un volumen de muestra mucho más pequeño lo que proporciona una buena resolución y una separación eficaz, aunque la sensibilidad se ve algo resentida.

➤ **Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

La cromatografía líquida es la técnica más apropiada para la separación de especies polares por lo que es una buena alternativa a la cromatografía de gases en la especiación de mercurio orgánico e inorgánico. Esta técnica presenta la ventaja de que no requiere la etapa previa de derivatización lo que permite conseguir una mejor separación de las especies de mercurio en muestras medioambientales complejas con un tratamiento de la muestra más sencillo (129). Además, su versatilidad hace que el acoplamiento a sistemas CV-AAS o CV-AFS sea muy fácil. Sin embargo, tiene el inconveniente de que su sensibilidad es mucho menor (al acoplarse a la detección por AAS se podría llegar a límites de detección de hasta $1 \mu\text{g L}^{-1}$, muy altos para el campo de la especiación) (5). Esto es debido sobre todo a los blancos como consecuencia de los grandes volúmenes de disolventes orgánicos empleados y al efecto de dilución correspondiente.

La mayor parte de las aplicaciones que utilizan la técnica de HPLC se basan en la utilización de separaciones en fase reversa donde la fase

estacionaria se encuentra fijada en una base de sílice (189). Con el fin de mejorar la separación cromatográfica y/o evitar la adsorción de las especies de mercurio en la fase estacionaria, en ocasiones se emplean agentes complejantes como la cisteína, el β -mercaptoetanol o agentes formadores de pares iónicos (5, 189).

5.1.5 DETECCIÓN DE LAS ESPECIES DE MERCURIO

Los requerimientos analíticos de selectividad y sensibilidad para una especiación fidedigna de metales tóxicos presentes en el medio ambiente en niveles de trazas y ultratrazas son extremadamente altos. Por este motivo, los detectores utilizados en este tipo de determinaciones deben poseer tanto una sensibilidad como una selectividad excepcional para el elemento que se quiere especiar. Así pues, la opción más empleada consiste en el acoplamiento de un detector atómico “on-line” con la columna cromatográfica (GC o HPLC) a través de la interfase adecuada.

Las características deseables en un detector para ser utilizado en una técnica de separación híbrida para la especiación de metales traza son las que se enumeran a continuación (5):

- Alta sensibilidad
- Alta especificidad
- Capacidad para trabajar con gases (para GC)
- Capacidad para trabajar con líquidos (para HPLC)
- Operación continua “on-line” con la columna de separación
- Información en tiempo real
- Amplio rango dinámico lineal
- Capacidad multielemental y multiisotópica

En el pasado, uno de los detectores más utilizados para en el análisis de mercurio, fue el de captura electrónica (ECD) (128, 143, 190), que todavía es incluido en la configuración experimental de algunos trabajos (191). Sin embargo, actualmente destacan otros detectores elemento-específicos como: espectrometría de absorción atómica (AAS), espectrometría de fluorescencia atómica (AFS), espectrometría de emisión atómica (AES) y el plasma acoplado inductivamente con espectrometría de masas (ICP-MS). No obstante, la especiación de compuestos de mercurio se basa en el acoplamiento de estos detectores con una de las técnicas de separación anteriormente comentadas.

Algunos ejemplos de los acoplamientos o sistemas híbridos más utilizados para la separación y determinación de las especies de mercurio son los siguientes:

- **CE-ICP-MS:** Para acoplar con éxito la electroforesis capilar con el ICP-MS debe ser introducida una corriente reguladora adicional con el fin de obtener un aerosol estable desde el nebulizador. No obstante, debido al pequeño volumen de muestra inyectado los límites de detección de esta técnica son relativamente altos lo que hace que aún se deba mejorar para su uso en los análisis de especiación de metales a niveles de ultratrazas (192).
- **HPLC-(CV)-AAS:** En este caso la columna se acopla al detector mediante un método de derivatización on-line de las especies separadas. Así, mediante la generación del vapor frío (CV-AAS) se disminuyen los límites de detección y se facilita la detección de las especies de mercurio (193-195).
- **HPLC-(CV)-AFS:** Al igual que en la técnica anterior el acoplamiento de la columna y el detector se realiza mediante una derivatización on-line de las especies que implica la generación de vapor frío (129, 196-200).

- **HPLC-(CV)-ICP-MS:** El acoplamiento entre el HPLC y el ICP-MS es mucho más simple que el necesario para acoplar este detector a un GC ya que no se precisa de una interfase tan compleja. Sin embargo, uno de los inconvenientes existentes es que las fases móviles utilizadas suelen contener cantidades considerables (5-100 %) de metanol o acetonitrilo lo que puede derivar en ciertas interferencias (201, 202). Esta técnica híbrida también puede emplear el método de la generación de vapor frío como forma de introducción de la muestra (203, 204), de ahí su modalidad HPLC-CV-ICP-MS.
- **GC-AAS:** El acoplamiento entre el GC y el detector se puede llevar a cabo con una etapa previa de derivatización (vapor frío) (205) o mediante un pirolizador (206). Este acoplamiento en ambas modalidades (GC-CV-AAS y GC-pyro-AAS) presenta el inconveniente de no alcanzar límites de detección suficientemente bajos y por ello se ha sustituido actualmente por detectores más sensibles.
- **GC-AES:** La espectroscopia de emisión atómica acoplada a un cromatógrafo de gases se ha utilizado ampliamente para la detección de organomercuriales desde hace años. Actualmente el plasma inducido por microondas (MIP-AES) se ha convertido en uno de los detectores específicos más populares para mercurio ya que acoplado a la GC proporciona una excelente sensibilidad y un alto grado de selectividad gracias a su intensa emisión y baja señal de fondo. En la mayoría de los casos, la muestra se introduce previa derivatización de los analitos (142, 158, 207, 208), por lo que es posible eliminar los problemas ocasionados en la separación de los haluros de mercurio. No obstante, el GC-MIP-AES también se ha empleado con el sistema de espacio en cabeza (head space) para la introducción de la muestra (209).

- **GC-AFS:** La fluorescencia atómica es una de las técnicas de determinación de mercurio más sensibles y selectivas que existe en la actualidad. Al igual que ocurría con la espectroscopia de absorción atómica, su acoplamiento a la cromatografía de gases puede llevarse a cabo mediante un método de derivatización on-line de las especies (vapor frío) (168) o mediante un pirolizador (174). En cuanto a la introducción de la muestra en el cromatógrafo, existen tanto métodos donde se emplea la derivatización previa (151, 210), como la inyección directa de la fase orgánica resultante de la extracción (188).

- **GC-ICP-MS:** La introducción del plasma acoplado inductivamente como fuente de iones para la espectrometría de masas supuso una importante innovación dentro de los detectores de metales traza debido a su especificidad, alta sensibilidad y carácter multielemental. La unión de este detector con un cromatógrafo de gases requiere de una interfase adecuada. Además de sus buenas prestaciones, esta técnica acoplada permite obtener información sobre las posibles transformaciones de las especies de mercurio durante los procesos de pretratamiento de la muestra mediante la medida de relaciones isotópicas (142, 154, 211).

Los límites de detección alcanzados por cada una de estas técnicas híbridas utilizadas en la especiación de mercurio aparecen indicados en la *tabla 1.3*. Como puede observarse en dicha tabla, de entre las distintas posibilidades de detección, los detectores más sensibles y selectivos para este tipo de determinaciones serían tanto el ICP-MS como la fluorescencia atómica.

Tabla 1.3. Técnicas híbridas con detección específica para especiación de mercurio (5)

TIPO DE SEPARACIÓN	TIPO DE DETECCIÓN	LÍMITES DE DETECCIÓN (Intervalo)
GC	(CV)-AAS	5-167 pg
HPLC	(CV)-AAS	4-16 $\mu\text{g L}^{-1}$
GC	ETAAS	0,04 ng
GC	(CV)-AFS	0,01-6 ng L^{-1} ; 0,6-1,3 pg
HPLC	(CV)-AFS	0,015-0,1 μg
GC	MIP-AES	0,04-10 ng L^{-1}
HPLC	(CV)-MIP-AES	0,35 ng mL^{-1}
GC	ICP-AES	0,6 ng L^{-1} ; 3,0 pg
HPLC	ICP-AES	0,1 ng mL^{-1}
GC	ICP-MS	0,12-1 pg
HPLC	ICP-MS	16-400 ng L^{-1}

6.- JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

Teniendo en cuenta la diferente toxicidad y las posibilidades de transformación en el medio ambiente, es evidente que la determinación de contenidos de mercurio total no proporciona una información suficiente por lo que se hace necesaria la especiación en niveles de concentración del orden de ultratrazas. Estas circunstancias constituyen un reto para la química analítica ya que es necesario diferenciar entre esos derivados del mercurio que, por otra parte, se encuentran en concentraciones extremadamente bajas en matrices complejas.

La química analítica actual se sirve fundamentalmente de métodos que acoplan una técnica de separación generalmente cromatográfica con elevado poder de resolución y un detector muy sensible. Así según lo descrito anteriormente, un posible acoplamiento instrumental que parece interesante para llevar a cabo la especiación de mercurio consiste en el acoplamiento de un cromatógrafo de gases utilizando una columna capilar con un detector de fluorescencia atómica vía pirólisis térmica. Esta aproximación, a pesar de ser mucho más económica que el ICP-MS, no ha sido muy explotada hasta el momento de ahí que sea de especial interés incidir en su desarrollo.

No obstante, el verdadero problema analítico, sin resolver aún completamente, se encuentra en las etapas previas a la separación cromatográfica y obtención de la señal analítica. Para el análisis de muestras sólidas (suelos, sedimentos y muestras biológicas de origen animal y vegetal) es necesaria una etapa previa de extracción de la matriz que va a ser particularmente crítica cuando se trata de mantener la distribución de especies en las muestras reales. En los últimos años, se ha generado una cierta controversia acerca de la posibilidad de que algunos de los sistemas actualmente utilizados para la separación de las especies orgánicas (principalmente destilación) estuvieran produciendo una alteración de los resultados, ya que podría estarse formando metilmercurio a partir del mercurio inorgánico presente en las muestras. Todo ello hace necesario incidir en las etapas de pretratamiento de la muestra ya que es importante lograr una extracción de las diferentes especies de su matriz sin que ocurra una alteración de las mismas y consiguiendo límites de detección adecuados. Por último, es conveniente validar la nueva metodología analítica desarrollada para lo que se utilizarán materiales de referencia certificados de interés medioambiental. Esto va a permitir conocer la exactitud y precisión de los métodos analíticos así como establecer su posible campo de aplicación y sus limitaciones.

A pesar de que el mercurio es, probablemente, una de las sustancias tóxicas ambientales de mayor relevancia, quedan aún muchas cuestiones

abiertas respecto al ciclo y transporte del mercurio en el medio ambiente. Así, su estudio en lugares con una exposición prolongada, como es el caso de la Comarca de Almadén, constituye una oportunidad única. Dicha comarca es conocida a escala mundial por los yacimientos de cinabrio que se encuentran en la zona. Por tanto, las operaciones mineras de Almadén han generado el caso más antiguo y relevante de emisión de mercurio al medio ambiente del mundo. Debido a que los efluentes son dispersados a los ecosistemas acuáticos y terrestres, tanto la flora y fauna como la población de la región van a estar expuestos a niveles elevados de mercurio, aunque no se conoce bien ni la extensión ni los efectos de dicha contaminación por mercurio.

Así pues, teniendo en cuenta la importancia de la Comarca de Almadén en lo que a las emisiones de mercurio al medio ambiente se refiere, se consideró interesante realizar aplicaciones de los métodos de especiación de mercurio desarrollados a muestras de dicha zona. De esta manera, los resultados obtenidos en cuanto a los niveles de mercurio en los distintos compartimentos acuáticos permitirían estudiar el comportamiento del mercurio en esta zona y comparar los resultados con los obtenidos en otros ecosistemas también expuestos a contaminación por este metal así como evaluar sus implicaciones toxicológicas.

7.- BIBLIOGRAFÍA

1. **Arribas, S.** *La fascinante historia de la Alquimia descrita por un científico moderno*. Oviedo: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Oviedo, 1991.
2. **Moreno Grau, M. D.** *Toxicología ambiental: evaluación de riesgo para la salud humana*. Madrid: Ed. Mc Graw Hill, 2003.
3. **Eisler, R.** Mercury hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. *U.S. Fish and Wildlife Service Biological Report*. 1987, Vol. 85, 1.10.
4. **Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA): Productos Químicos.** Evaluación mundial sobre el mercurio. Programa Interorganismos para la Gestión Racional de las Sustancias Químicas. <http://www.chem.unep.ch/mercury>. 2002.
5. **Sánchez Uría, J.E., Sanz-Medel, A.** Inorganic and methylmercury speciation in environmental samples. *Talanta*. 1998, Vol. 47, p. 509-524.
6. **Tchounwou, P.B., Ayensu, W.K., Ninashvili, N., Sutton, D.** Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health. *Environmental Toxicology*. 2003, Vol. 18, p. 149-175.
7. **Seixas, S., Bustamante, P., Pierce, G.** Accumulation of mercury in the tissues of the common octopus *Octopus vulgaris* (L.) in two localities on the Portuguese coast. *Science of the Total Environment*. 2005, Vol. 340, p. 113-120.
8. **Boening, D.W.** Ecological effects, transport and fate of mercury: a general review. *Chemosphere*. 2000, Vol. 40, p. 1335-1351.
9. **Gochfeld, M.** Cases of mercury exposure, bioavailability and absorption. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2003, Vol. 56, p. 174-179.
10. **Clarkson, T.W., Magos, L.** The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Critical Reviews in Toxicology*. 2006, Vol. 36, p. 609-662.
11. **Stein, E.D., Cohen, Y., Winer, A.M.** Environmental distribution and transformation of mercury compounds. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 1996, Vol. 26, p. 1-43.
12. **Fitzgerald, W.F.** *Global biogeochemical cycling of mercury*. Bethesda: Reunión de la DOE/FDA/EPA sobre metilmercurio y salud, 1996.

13. Morel, F.M.M., Krapier, A.M.L., Amyot, M. The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 1998, Vol. 29, p. 543-566.
14. Schroeder, W.H., Yarwood, G., Niki, H. Transformation processes involving mercury species in the atmosphere. *Water, Air and Soil Pollution*. 1991, Vol. 56, p. 653-666.
15. Nelson, P.F., Peterson, C., Morrison, A. Atmospheric emissions of mercury - sources and chemistry. *Clean air and environmental quality*. 2004, Vol. 38(4), p. 48-55.
16. Petersen, G., Iverfeldt, Å., Munthe, J. Atmospheric mercury species over central and Northern Europe. Model calculations and nordic air and precipitation network for 1987 and 1988. *Atmospheric Environment*. 1995, Vol. 29, p. 47-67.
17. Pirrone, N., Costa, P., Pacyna, J.M., Ferrara, R. Mercury emissions to the atmosphere from natural and anthropogenic sources in the Mediterranean region. *Atmospheric Environment*. 2001, Vol. 35, p. 2997-3006.
18. Carpi, A., Lindberg, S.E. Sunlight-mediated emission of elemental mercury from soil amended with municipal sewage sludge. *Environmental Science and Technology*. 1997, Vol. 31, p. 2085-2091.
19. Schuster, E. The behavior of mercury in the soil with special emphasis on complexation and absorption processes: a review of the literature. *Water, Air and Soil Pollution*. 1991, Vol. 56, p. 667-680.
20. United States Department of Health and Human Services. Toxicological profile for mercury. Agency for toxic substances and disease registry. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp46.pdf>. 1999.
21. Boudou, A., Maury-Brachet, R., Coquery, M., Durrieu, G., Cossa, D. Synergic effect of gold mining and damming on mercury contamination in fish. *Environmental Science and Technology*. 2005, Vol. 39, p. 2448-2454.
22. Stoichev, T., Amouroux, D., Rodríguez Martín-Doimeadios, R.C., Monperrus, M., Donard, O.F.X., Tsalev, D.L. Speciation analysis of mercury in aquatic environment. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2006, Vol. 41, p. 591-619.
23. Belger, L., Forsberg, B.R. Factors controlling Hg levels in two predatory fish species in the Negro river basin, Brazilian Amazon. *Science of the Total Environment*. 2006, Vol. 367, p. 451-459.

24. **Cornelis, R., Crews, H., Caruso, J., Heumann, K.G.** *Handbook of elemental speciation II: Species in the environment, food, medicine & occupational health*. Chichester: John Wiley & Sons, 2005.
25. **Weber, J., Evans, R., Jones, S.H., Hines, M.E.** Conversion of mercury(II) into mercury(0), monomethylmercury cation and dimethylmercury in saltmarsh sediment slurries. *Chemosphere*. 1998, Vol. 36, p. 1669-1687.
26. **Barnett, M.O., Harris, L.A., Turner, R.R., Stevenson, R.J., Henson, T.J., Melton, R.C., Hoffman, D.P.** Formation of mercuric sulfide in soil. *Environmental Science and Technology*. 1997, Vol. 31, p. 3037-3043.
27. **Bloom, N.S., Watras, C.J.** Observations of methylmercury in precipitation. *Science of the Total Environment*. 1989, Vol. 87, p. 199-207.
28. **Schlesinger, W.H.** *Biogeochemistry: an analysis of global change*. San Diego: Academic Press, 1997.
29. **Gómez-Ariza, J.L., Lorenzo, F., García-Barrera, T.** Guidelines for routine mercury speciation analysis in seafood by gas chromatography coupled to a home-modified AFS detector. Application to the Andalusian coast (south Spain). *Chemosphere*. 2005, Vol. 61, p. 1401-1409.
30. **Jay, J.A., Morel, F.M.M., Hemond, H.F.** Mercury speciation in the presence of polysulfides. *Environmental Science and Technology*. 2000, Vol. 34, p. 2196-2200.
31. **Hintelmann, H., Welbourn, P.M., Evans, R.D.** Landscape controls on mercury in streamwater at Acadia National Park, USA . *Environmental Science and Technology*. 1997, Vol. 31, p. 489-495.
32. **Cabañero, A.I., Madrid, Y., Cámara, C.** Selenium and mercury bioaccessibility in fish samples: an in vitro digestion method. *Analytica Chimica Acta*. 2004, Vol. 526, p. 51-61.
33. **Shao, L.J., Gan, W.E., Shu, Q.D.** Determination of total and inorganic mercury in fish samples with on-line oxidation coupled to atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2006, Vol. 562, p. 128-133.
34. **Cabañero Ortiz, A.I.** *Acumulación-interacción de especies de mercurio y selenio en tejidos animales: desarrollo de nuevas metodologías de análisis*. Tesis Doctoral, 2005.
35. http://pages.usherbrooke.ca/biomedias/eco_transformations_microb.htm.

36. **Gilmour, C.C., Henry, A.E.** Mercury methylation in aquatic systems affected by acid deposition. *Environmental Pollution*. 1991, Vol. 71, p. 131-170.
37. **Zillioux, E.J., Porcella, D.B., Benoit, J.M.** Mercury cycling and effects in fresh-water wetland ecosystems. *Environmental Toxicology Chemistry*. 1993, Vol. 12, p. 2245-2264.
38. **Munthe, J.** The aqueous oxidation of elemental mercury by ozone. *Atmospheric Environment*. 1992, Vol. 26A, p. 1461-1468.
39. **Lin, S., Pehkonen, S.O.** The chemistry of atmospheric mercury: a review. *Atmospheric Environment*. Vol. 33, p. 2067-2079.
40. **Mason, R.P., Fitzgerald, W.F.** The distribution and biogeochemical cycling of mercury in the equatorial Pacific Ocean. *Deep Sea Research*. 1993, Vol. 40, p. 1897-1924.
41. **Tseng, C M., Amouroux, D., Abril, G., Tessier, E., Etcheber, H., Donard, O.F.X.** Speciation of mercury in a fluid mud profile of a highly turbid macrotidal estuary (Gironde, Francia). *Environmental Science and Technology*. 2001, Vol. 35, p. 2627-2633.
42. **Weber, J.H.** Review of possible paths for abiotic methylation of mercury (II) in the aquatic environment. *Chemosphere*. 1993, Vol. 26, p. 2063-2077.
43. **Weber, J.H.** Volatile hydride and methyl compounds of selected elements formed in the marine environment. *Marine Chemistry*. 1999, Vol. 65, p. 67-75.
44. **Nascimento, A.M.A., Chartone-Souza, E.** Operon mer: bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. *Genetics and Molecular Research*. 2003, Vol. 2(1), p. 92-101.
45. **Svobodová, Z., Dusek, L., Hehtmánek, M., Vykusová, B., Smíd, R.** Bioaccumulation of mercury in various fish species from Orlík and Kamýk water reservoirs in the Czech Republic. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 1999, Vol. 43, p. 231-240.
46. **Ullrich, S.M., Tanton, T.W., Abdrashitova, S.A.** Mercury in the aquatic environment: a review of factors affecting methylation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 2001, Vol. 31, p. 241-293.
47. **Leermakers, M., Galletti, S., de Galan, S., Brion, N. and Baeyens, W.** Mercury in the southern North Sea and Scheldt estuary. *Marine Chemistry*. 2001, Vol. 75, p. 229-248.

48. **Pongratz, R., Heumann, K.G.** Production of methylated mercury and lead by polar macroalgae – a significant natural source for atmospheric heavy metals in clean room compartments. *Chemosphere*. 1998, Vol. 36, p. 1935-1946.
49. **Quevauviller, P., Donard, O.F.X., Wasserman, J.C., Martin, F.M., Schneider, J.** Occurrence of methylated tin and dimethylmercury compounds in a mangrove core from Sepetiba Bay, Brazil. *Applied Organometallic Chemistry*. 1992, Vol. 6, p. 221-228.
50. **Craig, P.J.** *Environmental aspects of organometallic chemistry, in comprehensive organometallic chemistry, the synthesis; reactions and structures of organometallic compounds*. Pergamon Press Oxford, 1982. Vol. 2.
51. **Cai, Y. Jaffé, R., Jones, R.** Ethylmercury in the soils and sediments of the Florida Everglades. *Environmental Science and Technology*. 1997, Vol. 31, p. 302-305.
52. **Marvin-Dipasquales, M., Agee, J., McGowan, C., Oremland, R.S., Thomas, M., Krabbenhoft, D., Gilmour, C.C.** Methylmercury degradation pathways: a comparison among three mercury-impacted ecosystems. *Environmental Science and Technology*. 2000, Vol. 34, p. 4908-4916.
53. **Oremland, R.S., Culbertson, C.W., Winfrey, M.R.** Methylmercury decompositions in sediments and bacterial cultures: involvement of methanogens and sulfate reducers in oxidative demethylation. *Applied Organometallic Chemistry*. 1991, Vol. 13, p. 715-725.
54. **Pak, K.R., Bartha, R.** Mercury methylation and demethylation in anoxic lake sediments and by strictly anaerobic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998, Vol. 64, p. 1013-1017.
55. **Gray, J.S.** Biomagnification in marine systems: the perspective of an ecologist. *Marine Pollution Bulletin*. 2003, Vol. 45, p. 46-52.
56. **Castilhos, Z.C., Rodrigues-Filho, S., Rodrigues, A.P., Villas-Bôas, R.C., Veiga, M.M., Beinhoff, C.** Biomagnification of mercury in fish from gold mining affected Amazonian aquatic systems. *7th International Conference on Mercury as a Global Pollutant*. Rio de Janeiro, 2004.
57. **Mason, R.P., Reinfelder, J.R., Morel, F.M.M.** Uptake, toxicity and trophic transfer of mercury in a coastal diatom. *Environmental Science and Technology*. 1996, Vol. 30, p. 1835-1845.

58. **Abreu, S.N., Pereira, E., Vale, C., Duarte, A.C.** Accumulation of mercury in Sea Bass a contaminated lagoon (Ria de Aveiro, Portugal). *Marine Pollution Bulletin*. 2000, Vol. 40, p. 393-397.
59. **Zahir, F., Rizwi, S.J., Haq, S.K., Khan, R.H.** Low dose mercury toxicity and human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2005, Vol. 20, p. 351-360.
60. **Harris, H.H., Pickering, I.J., George, G.N.** The chemical form of mercury in fish. *Science*. 2003, Vol. 301, p. 1203.
61. **Río Segade, S., Tyson, J.F.** Evaluation of two flow injection systems for mercury speciation analysis in fish tissue by slurry cold vapour atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytic Atomic Spectrometry*. 2003, Vol. 18, p. 268-273.
62. **Storelli, M.M., Storelli, A., Giacomini-Stuffler, R., Marcotrigiano, G.O.** Mercury speciation in muscle of two commercially important fish, hake (*Merluccius merluccius*) and striped mullet (*Mullus barbatus*) from the Mediterranean sea: estimated weekly intake. *Food Chemistry*. 2005, Vol. 89, p. 295-300.
63. http://www.ec.gc.ca/ceqg-rcqe/English/Html/Mercury/merc_what.cfm.
64. **Gagnon, C., Fisher, N.S.** Bioavailability of sediment-bound methyl and inorganic mercury to a marine bivalve. *Environmental Science and Technology*. 1997, Vol. 31, p. 993-998.
65. **Horvat, M., Covelli, S., Faganelli, J., Logar, M., Mandic, V., Rajar, R., Sirca, A., Zagar, D.** Mercury in contaminated coastal environments - a case study: the Gulf of Trieste. *Science of the Total Environment*. 1999, Vol. 237/238, p. 43-56.
66. **Gilmour, C.C., Riedel, G.S.** A survey of size-specific mercury concentrations in game fish from Maryland fresh and estuarine waters. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2000, Vol. 39, p. 53-59.
67. **Gnamus, A., Byrne, A. R., Horvat, M.** Mercury in the soil-plant-deer-predator food chain of a temperate forest in Slovenia. *Environmental Science and Technology*. 2000, Vol. 34, p. 3337-3345.
68. **Ebinghaus, R., Tripathi, R.M., Wallschläger, D., Lindberg, S.E.** Natural and anthropogenic mercury sources and their impact on the air-surface exchange of mercury on regional and global scales. *Mercury Contaminated Sites*. 1999.
69. **Brinck, J.W., Van Wambeke, L.** World resources of mercury. *I Congreso Internacional del Mercurio*. Barcelona, 1973.

70. **Varekamp, J.C., Buseck, P.R.** Global mercury flux from volcanic and geothermal sources. *Applied Geochemistry*. 1986, Vol. 1, p. 65-73.
71. **Varekamp, J.C., Waibel, A.F.** Natural cause for mercury pollution at Clear Lake, California, and paleotectonic interferences. *Geology*. 1987, Vol. 15, p. 1018-1021.
72. **Lamborg, C.H., Fitzgerald, W.F., O'Donnell, J., Torgenser, T.** A non-steady compartmental model of global-scale mercury geochemistry with interhemispheric atmospheric gradients. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 2002, Vol. 66, p. 1105-1118.
73. **Fitzgerald, W.F., Engstrom, D.R., Mason, R.P., Nater, E.A.** The case for atmospheric mercury contamination in remote areas. *Environmental Science and Technology*. 1998, Vol. 32, p. 1-7.
74. **Schroeder, W.H., Munthe, J.** Atmospheric mercury - an overview. *Atmospheric Environment*. 1998, Vol. 32, p. 809-822.
75. **Pirrone, N., Keeler, G.J., Nriagu, J.O.** Regional differences in worldwide emissions of mercury to the atmosphere. *Atmospheric Environment*. 1996, Vol. 30, p. 2981-2987.
76. **Leermakers, M., Baeyens, W., Quevauviller, P., Horvat, M.** Mercury in environmental samples: speciation, artifacts and validation. *Trends in Analytical Chemistry*. 2005, Vol. 24, p. 383-393.
77. **Clarkson, T.W.** The toxicology of mercury and its compounds. C.J., Huckabee, J.W. Watras. *Mercury Pollution: Integration and Synthesis*. Boca Raton: Ed. Lewis Publishers, 1992.
78. **WHO (World Health Organization), IARC (International Agency for Research on Cancer).** Beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry: summary of data reported and evaluation. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. 1997, Vol. 58, p. 14-19.
79. **Wolfe, M.F., Schwarzbach, S., Sulaiman, R.A.** Effects of mercury on wildlife: a comprehensive review. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 1998, Vol. 17, p. 146-160.
80. **Comisión de las Comunidades Europeas.** Estrategia comunitaria sobre el mercurio. Comunicación de la Comisión al Consejo y al Parlamento Europeo (COM). http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/es/com/2005/com2005_0020es01.pdf.
81. **Doadrio Villarejo, A.L.** Ecotoxicología y acción toxicológica del mercurio. <http://www.raf.es/pdf/articulos/toxicologiadelmercurio.pdf>.

82. WHO (World Health Organization), ICPS (International Program on Chemical Safety). Methylmercury. *Environmental Health Criteria 101*. Ginebra: World Health Organization, 1990.
83. WHO (World Health Organization), ICPS (International Program on Chemical Safety). Inorganic mercury. *Environmental Health Criteria 118*. Ginebra: World Health Organization, 1991.
84. Tsubaki, T., Irukayama, K. *Minamata Disease*. Tokio: Kodasha Ltd., 1977.
85. Powell, P.P. Minamata disease: a story of mercury's malevolence. *Southern Medical Journal*. 1991, Vol. 84, p. 1352-1358.
86. Harada, M. Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Critical Reviews in Toxicology*. 1995, Vol. 25, p. 1-25.
87. Kudo, A., Miyahara, S. A case history: Minamata mercury pollution in Japan – from loss of human lives to decontamination. *Water Science and Technology*. 1991, Vol. 23, p. 283-290.
88. Graeme, K.A., Pollack, C.V. Heavy Metal Toxicity, Part I: Arsenic and Mercury. *Journal of Emergency Medicine*. 1998, Vol. 16, p. 45-56.
89. WHO (World Health Organization). *Conference on intoxications due to alkylmercury treated seed*. Bagdad, 1974.
90. Maury-Brachet, R., Durrieu, G., Dominique, Y., Boudou, A. Mercury distribution in fish organs and food regimes: significant relationships from twelve species collected in French Guiana (Amazonian basin). *Science of the Total Environment*. 2006, Vol. 368, p. 262-270.
91. Rouessac, F., Rouessac, A. *Análisis Químico. Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas*. Madrid: Ed. Mc Graw-Hill, 2003. Capítulo 13.
92. Skoog, D.A., Leary, J.J. *Análisis Instrumental*. Madrid: Ed. Mc Graw-Hill, 2001. 5ª edición.
93. Lorenzo García, F. *Contribuciones a la especiación de mercurio mediante cromatografía acoplada a detectores atómicos y de masas. Aplicación a muestras medioambientales. Posibilidades de multiespeciación*. Tesis Doctoral, 2004.
94. Greenfield, S. Atomic fluorescence spectrometry: progress and future prospects. *Trends in Analytical Chemistry*. 1995, Vol. 14, p. 435-442.

95. Hatch, W.R., Ott, W.L. Determination of submicrogram quantities of mercury by atomic absorption spectrometry. *Analytical Chemistry*. 1968, Vol. 40, p. 2085-2087.
96. Willard, H., Merrit, L., Dean, J., Settle, F. *Instrumental methods of analysis*. California: Wadsworth Publishing Company, 1988. 7th edition.
97. Zoorob, G.K., Mc Kiernan, J.W., Caruso, J.A. ICP-MS for elemental speciation studies. *Mikrochimica acta*. 1998, Vol. 128, p. 145-168.
98. Rodríguez Martín-Doimeadios, R.C., Krupp, E., Amouroux, D., Donard, O.F.X. Application of isotopically labeled methylmercury for isotope dilution analysis of biological samples using gas chromatography/ICPMS. *Analytical Chemistry*. 2002, Vol. 74, p. 2505-2512.
99. Rodríguez-González, P., Marchante-Gayón, J.M., García Alonso, J.I., Sanz-Medel, A. Isotope dilution analysis for elemental speciation: a tutorial review. *Spectrochimica Acta Part B*. 2005, Vol. 60, p. 151-207.
100. Schaumlöffel, D., Lobinski, R. Isotope dilution technique for quantitative analysis of endogenous trace element species in biological systems. *International Journal of Mass Spectrometry*. 2005, Vol. 242, p. 217-223.
101. Monperrus, M., Krupp, E., Amouroux, D., Donard, O.F.X., Rodríguez Martín-Doimeadios, R.C. Potential and limits of speciated isotope-dilution analysis for metrology and assessing environmental reactivity. *Trends in Analytical Chemistry*. 2004, Vol. 23, p. 261-272.
102. Quevauiller, Ph., Maier, E.A., Griepink, B. *Quality assurance for environmental analysis*. Amsterdam: Ed. Elsevier, 1995.
103. Cámara, C., Fernández, P., Martín-Esteban, A., Pérez-Conde, C., Vidal, M. *Toma y tratamiento de muestras*. Madrid: Ed. Síntesis, 2003.
104. Farey, B.J., Nelson, L.A., Rolph, M.G. Rapid technique for breakdown of organic mercury-compounds in natural waters and effluents. *Analyst*. 1978, Vol. 103, p. 656-660.
105. Kramer, K.J.M., Quevauiller, P., Dorten, W.S., Van der Vlies, E.M., De Haan, H.P.M. Certification of total mercury in a sea-water reference material, CRM 579. *Analyst*. 1998, Vol. 123, p. 959-963.
106. AENOR. *Calidad del agua. Determinación del mercurio por espectrometría de fluorescencia atómica*. Norma Española UNE-EN 13506, 2002.

107. **EPA.** *Mercury in liquid waste.* EPA Method 7470 A, 1994.
108. **Bartha, A., Ikrényi, K.** Interfering effects on the determination of low concentrations of mercury in geological materials by cold-vapour atomic-absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta.* 1982, Vol. 139, p. 329-332.
109. **Cánario, J., Vale, C., Caetano, M.** Distribution of monomethylmercury and mercury in surface sediments of the Tagus Estuary (Portugal). *Marine Pollution Bulletin.* 2005, Vol. 50, p. 1121-1145.
110. **Pereira, M. E., Duarte, A. C., Millward, G. E., Abreu, S. N., Vale, C.** An estimation of industrial mercury stored in sediments of a confined area of the lagoon of Aveiro (Portugal). *Water Science and Technology.* 1998, Vol. 37, p. 125-130.
111. **Mikac, N., Niessen, S., Ouddane, B., Wartel, M.** Speciation of mercury in the sediments of the Seine estuary (France). *Applied Organometallic Chemistry.* Vol. 13, p. 715-725.
112. **Nguyen, H.L., Leermakers, M., Kurunczi, S., Bozo, L., Baeyens, W.** Mercury distribution and speciation in Lake Balaton, Hungary. *Science of the Total Environment.* 2005, Vol. 340, p. 231-246.
113. **Shi, J., Liang, L., Jiang, G., Jin, X.** The speciation and bioavailability of mercury in sediments of Haihe River, China. *Environment International.* 2005, Vol. 31, p. 357-365.
114. **Baeyens, W., Meuleman, C., Muhaya, B., Leermakers, M.** Behaviour and speciation of mercury in the Scheldt estuary (water, sediments and benthic organisms). *Hydrobiologia.* 1998, Vol. 366, p. 63-79.
115. **Kocman, D., Horvat, M., Kotnik, J.** Mercury fractionation in contaminated soils from the Idrija mercury mine region. *Journal of Environment Monitoring.* 2004, Vol. 6, p. 696-703.
116. **Donkor, A.K., Bonzongo, J.C., Nartey, V.K., Adotey, D.K.** Mercury in different environmental compartments of the Pra River Basin, Ghana. *Science of the Total Environment.* 2006, Vol. 368, p. 164-176.
117. **Sunderland, E.M., Gobas, F.A.P.C., Branfireun, B.A., Heyes, A.** Environmental controls on the speciation and distribution of mercury in coastal sediments. *Marine Chemistry.* 2006, Vol. 102, p. 111-123.

118. Gilmour, C.C., Riedel, G.S., Ederington, M.C., Bell, J.T., Benoit, J.M., Gill, G.A., Stordal, M.C. Methylmercury concentrations and production rates across a trophic gradient in the northern Everglades. *Biogeochemistry*. 1998, Vol. 40, p. 327-345.
119. Varekamp, J.C., Buchholtz ten Brink, M.R., Mecray, E.L., Kreulen, B. Mercury in Long Island Sound sediments. *Journal of Coastal Research*. 2000, Vol. 16, p. 613-626.
120. Wasserman, J.C., Freitas-Pinto, A.A.P., Amouroux, D. Mercury concentrations in sediment profiles of a degraded tropical coastal environment. *Environmental Technology*. 2000, Vol. 21, p. 297-305.
121. Tseng, C.M., de Diego, A., Pinaly, H., Amouroux, D. and Donard, O.F.X. Cryofocussing coupled to atomic absorption spectrometry for rapid and simple mercury speciation in environmental matrices. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 1998, Vol. 13, p. 755-764.
122. Lorenzo, R.A., Vázquez, M.J., Carro, A.M., Cela, R. Methylmercury extraction from aquatic sediments, a comparison between manual, supercritical fluid and microwave-assisted techniques. *Trends in Analytical Chemistry*. 1999, Vol. 18, p. 410-416.
123. Morrison, M.A., Weber, J.H. Determination of monomethylmercury cation in sediments by vacuum distillation followed by hydride derivatization and atomic fluorescence spectrometric detection. *Applied Organometallic Chemistry*. 1997, Vol. 11, p. 761-769.
124. Bowles, K.C., Apte, S.C. Determination of methylmercury in sediments by steam distillation / aqueous-phase ethylation and atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2000, Vol. 419, p. 145-151.
125. Horvat, M., Bloom, N., Liang, L. Comparison of distillation with other current isolation methods for the determination of methylmercury compounds in low level environmental samples, Part I: Sediments. *Analytica Chimica Acta*. 1993, Vol. 281, p. 135-152.
126. Tseng, C.M., de Diego, A., Martín, F.M., Donard, O.F.X. Rapid and quantitative microwave-assisted recovery of methylmercury from standard reference sediments. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 1997, Vol. 12, p. 629-635.
127. Dietz, C., Madrid, Y., Cámara, C. Mercury speciation using capillary cold trap coupled with microwave induced plasma atomic emission spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2001, Vol. 16, p. 1397-1402.

128. Vázquez, M.J., Carro, A.M., Lorenzo, R.A., Cela, R. Optimization of methylmercury microwave-assisted extraction from aquatic sediments. *Analytical Chemistry*. 1997, Vol. 69, p. 221-225.
129. Ramalhosa, E., Rio Segade, S., Pereira, E., Vale, C., Duarte, A. Microwave assisted extraction for methylmercury determination in sediments by high performance liquid chromatography cold vapour atomic fluorescence spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2001, Vol. 16, p. 643-647.
130. Rahman, G.M.M., Kingston, H.M.S. Development of a microwave-assisted extraction method and isotopic validation of mercury species in soils and sediments. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2005, Vol. 20, p. 183-191.
131. Tseng, C.M., de Diego, A., Martin, F.M., Amouroux, D., Donard, O.F.X. Rapid determination of inorganic and methylmercury in reference biological samples by hydride generation, cryofocussing atomic absorption spectrometry after open-focused microwave field alkaline digestion. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 1997, Vol. 12, p. 743-750.
132. Välimäki, I., Perämäki, P. Determination of mercury species by capillary column GC-QTAAAS with purge and trap preconcentration technique. *Mikrochimica Acta*. 2001, Vol. 137, p. 191-201.
133. Río-Segade, S., Bendicho, C. Selective reduction method for separate determination of inorganic and total mercury in mussel tissue by flow-injection cold vapor technique. *Ecotoxicology and environmental safety*. 1999, Vol. 42, p. 245-252.
134. Cabañero, A.I., Madrid, Y., Cámara, C. Evaluation of different sample pre-treatment and extraction procedures for mercury speciation in fish samples. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2002, Vol. 17, p. 1595-1601.
135. Mason, T.J. Sonochemistry and sonoprocessing: the link, the trends and (probably) the future. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2003, Vol. 10, p. 175-179.
136. Michalke, B. Quality control and reference materials in speciation analysis. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. 1998, Vol. 363, p. 439-445.
137. Craig, P.J. *Organometallic compounds in the environment, principles and reactions*. Essex: Ed. Longman, 1986.
138. Lobinski, R. Elemental speciation and coupled techniques. *Applied Spectroscopy*. 1997, Vol. 51, pág. 260 A.

139. **Szpunar, J., Lobinski, R.** *Hyphenated techniques in speciation analysis*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2003.
140. **Sanz-Medel, A.** Trace element analytical speciation in biological systems: importance, challenges and trends. *Spectrochimica Acta B*. 1998, Vol. 53, p. 197-211.
141. **Westöo, G.** Determination of methylmercury compounds in foodstuff. *Acta Chemica Scandinavica*. 1966, Vol. 20, p. 2131-2137.
142. **Tu, Q., Qian, J., Frech, W.** Rapid determination of methylmercury in biological materials by GC-MIP-AES or GC-ICP-MS following simultaneous ultrasonic-assisted in situ ethylation and solvent extraction. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2000, Vol. 15, p. 1583-1588.
143. **Carro, A.M., Rubi, W., Bollain, M.H., Lorenzo, R.A., Cela, R.** Study of the distribution of methylmercury and total mercury in grain size fractions of freeze-dried estuarine sediment samples. *Applied Organometallic Chemistry*. 1994, Vol. 8, p. 665-676.
144. **Hempel, M., Hiltelmann, H., Wilken, R.D.** Determination of organic mercury species in soils by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Analyst*. 1992, Vol. 117, p. 669-675.
145. **Abuin, M., Carro, A.M., Lorenzo, R.A.** Experimental design of a microwave-assisted extraction-derivatization method for the analysis of methylmercury. *Journal of Chromatography A*. 2000, Vol. 889, p. 185-193.
146. **Thibaud, Y., Cossa, D.** An international intercalibration for methylmercury in biological tissue. *Applied Organometallic Chemistry*. 1989, Vol. 3, p. 257-266.
147. **Tseng, C.M., De Diego, A., Wasserman, J.C., Amouroux, D., Donard, O.F.X.** Potential interferences generated during mercury species determination using acid leaching, aqueous ethylation, cryogenic gas chromatography and atomic spectrometry detection techniques. *Chemosphere*. 1999, Vol. 39, p. 1119-1136.
148. **Capon, J.C., Smith, J.C.** Gas-chromatographic determination of inorganic mercury and organomercurials in biological materials. *Analytical Chemistry*. 1977, Vol. 49, p. 365-369.
149. **Capon, C.J., Smith, J.C.** A simple and rapid procedure for the gas-chromatographic determination of methylmercury in biological samples. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 1978, Vol. 19, p. 600-607.

150. **Filippelli, M.** Feasibility study for a BCR sediment methylmercury reference material production. *Chemosphere*. 1999, Vol. 39, p. 1199-1210.
151. **Hammerschmidt, C.R., Fitzgerald, W.F.** Formation of artifact methylmercury during extraction from a sediment reference material. *Analytical Chemistry*. 2001, Vol. 73, p. 5930-5936.
152. **Bloom, N.S.J.** Determination of picogram levels of methylmercury by aqueous phase ethylation, followed by cryogenic gas chromatography with cold vapour atomic fluorescence detection. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 1989, Vol. 46, p. 1131-1140.
153. **Grinberg, P., Campos, R.C., Mester, Z., Sturgeon R.E.** Solid phase microextraction capillary gas chromatography combined with furnace atomization plasma emission spectrometry for speciation of mercury in fish tissues. *Spectrochimica Acta Part B*. 2003, Vol. 58, p. 427-441.
154. **Hiltelmann, H., Falter, R., Ilgen, G., Evans, R.D.** Determination of artifactual methylmercury (CH_3Hg^+) formation in environmental samples using stable Hg^{2+} isotopes with ICP-MS detection: Calculation of contents applying species specific isotope addition. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. 1997, Vol. 57, p. 363-370.
155. **Falter, R., Hiltelmann, H., Quevauiller, P.** Conclusion of the workshop on "Sources of error in methylmercury determination during sample preparation, derivatisation and detection". *Chemosphere*. 1999, Vol. 39, p. 1039-1049.
156. **Bloom, N.S., Colman, J.A., Barber, L.** Formation of methylmercury during aqueous distillation and alternative techniques for the extraction of methylmercury from environmental samples. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. 1997, Vol. 358, p. 371-377.
157. **Larsens, P., Meuleman, C., Leermakers, M., Baeyens, W.** Determination of methylmercury in natural waters by head space gas chromatography with microwave plasma detection after preconcentration on a resin containing dithiocarbamate groups. *Analytica Chimica Acta*. 1990, Vol. 234, p. 417-424.
158. **Emteborg, H., Björklund, F., Ödman, F., Karlsson, L., Mathiasson, L., Frech, W., Baxter, D.C.** Determination of methylmercury in sediments using supercritical fluid extraction and gas chromatography coupled with microwave-induced plasma atomic emission spectrometry. *Analyst*. 1996, Vol. 19, p. 121-129.

159. **Carro, A.M., Mejuto, M.C.** Application of chromatographic and electrophoretic methodology to the speciation of organomercury compounds in food analysis. *Journal of Chromatography A*. 2000, Vol. 882, p. 283-307.
160. **Cai, Y., Monsalud, S., Furton, K.G.** Determination of methyl-mercury and ethylmercury compounds using gas chromatography atomic fluorescence spectrometry following aqueous derivatization with sodium tetraphenylborate. *Chromatographia*. 2000, Vol. 52, p. 82-86.
161. **Emteborg, H., Baxter, D.C., Sharp, M., Frech, W.** Evaluation, mechanism and application of solid-phase extraction using a dithiocarbamate resin for the sampling and determination of mercury species in humic-rich natural waters. *Analyst*. 1995, Vol. 120, p. 69-77.
162. **Lee, Y.H., Mowrer, J.** Determination of methylmercury in natural waters at the sub-nanograms per litre level by capillary gas chromatography after adsorbent preconcentration. *Analytica Chimica Acta*. 1989, Vol. 221, p. 259-268.
163. **Cai, Y., Bayona, M.N.** Determination of methylmercury in fish and river water samples using in situ sodium tetraethylborate derivatization following by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1995, Vol. 696, p. 113-122.
164. **Montuori, P., Jover, E., Alzaga, R., Diez, S., Bayona, J.M.** Improvements in the methylmercury extraction from human hair by headspace solid-phase microextraction followed by gas-chromatography cold-vapour atomic fluorescence spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2004, Vol. 1025, p. 71-75.
165. **Yang, L., Colombini, V., Maxwell, P., Mester, Z., Sturgeon, R.E.** Application of isotope dilution to the determination of methylmercury in fish tissue by solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2003, Vol. 1011, p. 135-142.
166. **Centineo, G., Blanco González, E., Sanz-Medel, A.** Multielemental speciation analysis of organometallic compounds of mercury, lead and tin in natural water samples by headspace-solid phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2004, Vol. 1034, p. 191-197.
167. **Jitaru, P., Adams, F.C.** Speciation analysis of mercury by solid-phase microextraction and multicapillary gas chromatography hyphenated to inductively coupled plasma-time-of-flight-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2004, Vol. 1055, p. 197-207.

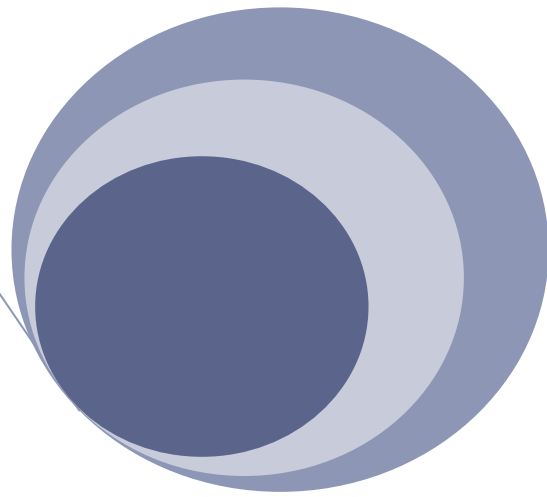
168. **Diez, S., Bayona, J.M.** Determination of methylmercury in human hair by ethylation followed by headspace solid-phase microextraction–gas chromatography–cold-vapour atomic fluorescence spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2002, Vol. 963, p. 345-351.
169. **Bravo-Sánchez, L.R., Ruiz Encinar, J., Hidalgo Martínez, J.I., Sanz-Medel, A.** Mercury speciation analysis in sea water by solid phase microextraction–gas chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry using ethyl and propyl derivatization. Matrix effects evaluation. *Spectrochimica Acta Part B*. 2004, Vol. 59, p. 59-66.
170. **Jitaru, P., Goenaga Infante, H., Adams, F.C.** Multicapillary gas chromatography coupled to inductively coupled plasma-time-of-flight mass spectrometry for rapid mercury speciation analysis in biological and environmental samples. *Analytica Chimica Acta*. 2003, Vol. 489, p. 45-57.
171. **De Diego, A., Tseng, C.M., Stoichew, T., Amouroux, D., Donard, O.F.X.** Interferences during mercury speciation determination by volatilization, cryofocusing, gas chromatography and atomic absorption spectroscopy: comparative study between hydride generation and ethylation techniques. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 1998, Vol. 13, p. 623-629.
172. **Stoichev, T., Rodríguez Martín-Doimeadios, R.C., Tessier, E., Amouroux, D., Donard, O.F.X.** Improvement of analytical performances for mercury speciation by on-line derivatization, cryofocussing and atomic fluorescence spectrometry. *Talanta*. 2004, Vol. 62, p. 433-438.
173. **Emteborg, H., Baxter, D.C., Frech, W.** Speciation of mercury in natural waters by capillary gas chromatography with a microwave-induced plasma emission detector following preconcentration using a dithiocarbamate resin microcolumn installed in a closed flow injection system. *Analyst*. 1993, Vol. 118, p. 1007-1013.
174. **Gómez-Ariza, J.L., Lorenzo, F., García-Barrera, T., Sánchez-Rodas, D.** Analytical approach for routine methylmercury determination in seafood using gas chromatography-atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2004, Vol. 511, p. 165-173.
175. **Armstrong, H.E.L., Corns, W.T., Stockwell, P.B., Connor, G.O., Ebdon, L., Evans, E.H.** Comparison of AFS and ICP-MS detection coupled with gas chromatography for the determination of methylmercury in marine samples. *Analytica Chimica Acta*. 1999, Vol. 390, p. 245-253.

176. **Liang, L., Bloom, N.S., Horvat, M.** Simultaneous determination of mercury speciation in biological materials by GC/CVAFS after ethylation and room-temperature precollection. *Clinical Chemistry*. 1994, Vol. 40, p. 602-607.
177. **Jiménez, M.S., Sturgeon, R.E.** Speciation of methyl- and inorganic mercury in biological tissues using ethylation and gas chromatography with furnace atomization plasma emission spectrometric detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 1997, Vol. 12, p. 597-601.
178. **Demuth, N., Heumann, K.G.** Validation of methylmercury determinations in aquatic systems by alkyl derivatization methods for GC analysis using ICP-IDMS. *Analytical Chemistry*. 2001, Vol. 73, p. 4020-4027.
179. **Monperrus, M., Tessier, E., Veschambre, S., Amouroux, D., Donard, O.F.X.** Simultaneous speciation of mercury and butyltin compounds in natural waters and snow by propylation and species-specific isotope dilution mass spectrometry analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2005, Vol. 381, p. 854-862.
180. **Huang, J.H.** Artifact formation of methyl and ethylmercury compounds from inorganic mercury during derivatization using sodium tetra(n-propyl)borate. *Analytica Chimica Acta*. 2005, Vol. 532, p. 113-120.
181. **Cai, Y., Monsalud, S., Jaffé, R., Jones, R.D.** Gas chromatography determination of organomercury following aqueous derivatization with sodium tetraethylborate and sodium tetraphenylborate. Comparative study of gas chromatography coupled with AFS, AES and MS. *Journal of Chromatography A*. 2000, Vol. 876, p. 147-155.
182. **Dabek-Zlotorzunska, E., Lai, E.P.C., Timerbaev, A.R.** Capillary Electrophoresis: the-state-of-the-art in metal speciation studies. *Analytica Chimica Acta*. 1998, Vol. 359, p. 1-26.
183. **Carro-Díaz, A.M., Lorenzo-Ferreira, R.A., Cela-Torrijos, R.** Capillary electrophoresis of methylmercury with injection by sample stacking. *Journal of Chromatography A*. 1996, Vol. 730, p. 345-351.
184. **Lee, T.H., Jiang, S.J.** Determination of mercury compounds by capillary electrophoresis inductively coupled plasma mass spectrometry with microconcentric nebulization. *Analytica Chimica Acta*. 2000, Vol. 413, p. 197-205.
185. **Silva da Rocha, M., Soldado A.B., Blanco-González, E., Sanz-Medel, A.** Speciation of mercury compounds by capillary electrophoresis coupled on-line with quadrupole and double-focusing inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2000, Vol. 15, p. 513-518.

186. Madrid, Y., Cabrero, C., Pérez-Corona, T., Cámara, C. Speciation of methylmercury and Hg(II) using bakers-yeast biomass (*Saccharomyces Cerevisiae*). Determination by continuous-flow mercury cold vapour generation atomic-absorption spectrometry. *Analytical Chemistry*. 1995, Vol. 67, p. 750-754.
187. Magos, L. Selective atomic-absorption determination of inorganic mercury and methylmercury in undigested biological samples. *Analyst*. 1971, Vol. 96, p. 847-853.
188. Alli, A., Jaffé, R., Jones, R. Analysis of organomercury compounds in sediments by capillary GC with atomic fluorescence detection. *Journal of High Resolution Chromatography*. 1994, Vol. 17, p. 745-748.
189. Harrington, C.F. The speciation of mercury and organomercury compounds by using high-performance liquid chromatography The speciation of mercury and organomercury compounds by using high-performance liquid chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*. 2000, Vol. 19, p. 167-179.
190. Cela, R., Lorenzo, R.A., Rubi, E., Botana, A., Valino, M. Mercury speciation in raw sediments of the Pontevedra estuary (Galicia-Spain). *Environmental Technology*. 1992, Vol. 13, p. 11-22.
191. Liu, R., Lu, X.G. Distribution and speciation of mercury in the peat bog of Xiaoxing'an Mountain, northeastern China. *Environmental Pollution*. 2003, Vol. 124, p. 39-46.
192. Majidi, V., Qvarnström, J., Tu, Q., Frech, W., Thomassen, Y. Improving sensitivity for CE-ICP-MS using multicapillary parallel separation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 1999, Vol. 14, p. 1933-1935.
193. Río-Segade, S., Bendicho, C. On-line high-performance liquid-chromatographic separation and cold vapor atomic absorption spectrometric determination of methylmercury and inorganic mercury. *Talanta*. 1999, Vol. 48, p. 477-484.
194. Eiden, R., Falter, R., Agustín-Castro, B., Shöler, H.F. Distillation, on-line RP C18 preconcentration and HPLC-UV-PCO-CVAAS as a new combination for the determination of methylmercury in sediments and fish tissue. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. 1997, Vol. 357, p. 439-441.
195. Qvarnström, J., Tu, Q., Frech, W., Lüdke, C. Flow injection-liquid chromatography-cold vapour atomic absorption spectrometry for rapid determination of methyl- and inorganic mercury. *Analyst*. 2000, Vol. 125(6), p. 1193-1197.

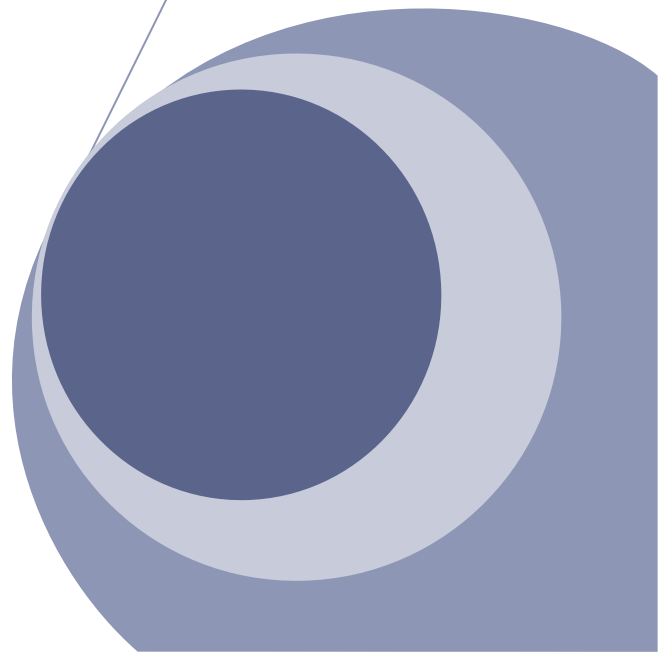
196. **Hiltelmann, H., Wilken, R.D.** Levels of total mercury and methylmercury compounds in sediments of the polluted Elbe River: influence of seasonally and spatially varying factors. *Science of the Total Environment*. 1995, Vol. 166, p. 1-10.
197. **Falter, R., Ilgen, G.** Determination of trace amounts of methylmercury in sediment and biological tissue by using water vapor distillation in combination with RP C18 preconcentration and HPLC-HPF/HHPN-ICP-MS. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. 1997, Vol. 358, p. 401-406.
198. **Hintelmann, H., Hempel, M., Wilken, R.D.** Observation of unusual organic mercury species in soils and sediments of industrially contaminated sites. *Environmental Science and Technology*. 1995, Vol. 29, p. 1845-1850.
199. **Bramanti, E., Lomonte, C., Onor, M., Zamboni, R., D'Ulivo, A., Raspi, G.** Mercury speciation by liquid chromatography coupled with on-line chemical vapour generation and atomic fluorescence spectrometric detection (LC-CVGAFS). *Talanta*. 2005, Vol. 66, p. 762-768.
200. **Liang, L.N., Jiang, G.B., Liu, J.F., Hu, J.T.** Speciation analysis of mercury in seafood by using high-performance liquid chromatography on-line coupled with cold-vapor atomic fluorescence spectrometry via a post column microwave digestion. *Analytica Chimica Acta*. 2003, Vol. 477, p. 131-137.
201. **Montes-Bayón, M., De Nicola, K., Caruso, J.A.** Liquid chromatography - inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of chromatography A*. 2003, Vol. 1000, p. 457-476.
202. **Qvarnström, J., Frech, W.** Mercury species transformations during sample pre-treatment of biological tissues studied by HPLC-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2002, Vol. 17(11), p. 1486-1491.
203. **Tu, W., Johnson, W., Buckley, B.** Mercury speciation analysis in soil samples by ion chromatography, post-column cold vapor generation and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2003, Vol. 18, p. 696-701.
204. **Chiou, C.S., Jiang, S.J., Danadurai, K.S.K.** Determination of mercury compounds in fish by microwave-assisted extraction and liquid chromatography-vapour generation-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*. 2001, Vol. 56, p. 1133-1142.
205. **Longbottom, J.E., Dressman, R.C.** *Chromatographic Newsletter*. 1973, Vol. 17.

206. Emteborg, H., Sinemus, H.W., Radziuk, B., Baxter, D.C., Frech, W. Gas chromatography coupled with atomic absorption spectrometry: a sensitive instrumentation for mercury speciation. *Spectrochimica Acta Part B*. 1996, Vol. 51, p. 829-837.
207. Quian, J., Skyllberg, U., Tu, Q., Bleam, W.F., Frech, W. Efficiency of solvent extraction methods for the determination of methyl mercury in forest soils. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. 2000, Vol. 367, p. 467-473.
208. Snell, J., Quian, J., Johansson, M., Smit, K., Frech, W. Stability and reactions of mercury species in organic solution. *Analyst*. 1998, Vol. 123, p. 905-909.
209. Quevauviller, P., Filipelli, M., Horvat, M. Method performance evaluation for methylmercury determination in fish and sediment. *Trends in Analytical Chemistry*. 2000, Vol. 19, p. 157-166.
210. Horvat, M., Liang, L., Bloom, N.S. Comparison of distillation with other current isolation methods for the determination of methyl mercury compounds in low level environmental samples. Part 2. Water. *Analytica Chimica Acta*. 1993, Vol. 282, p. 153-168.
211. García Alonso, J.I., Ruiz Encinar, J., Muñiz, C.S., Marchante Gayón, J.M., Sanz-Medel, A. *Plasma Source Mass Spectrometry: The New Millenium*. Cambridge: Holland, G., Tanner, D. (Eds.), 2001.



Capítulo II

Instrumentación y métodos experimentales



1.- INSTRUMENTACIÓN

SISTEMA DE FLUORESCENCIA ATÓMICA

Sistema de fluorescencia atómica Millenium Merlin modelo 10.025 (P.S.Analytical Ltd.) que permite el análisis de mercurio en muestras acuosas. Este analizador de mercurio consta de:

- Un generador de vapor frío de flujo continuo
- Un separador gas-líquido
- Un sistema para la eliminación de humedad mediante el uso de una membrana higroscópica (membrana Perma-Pure)
- Un espectrómetro de fluorescencia atómica
- Una tarjeta de interfase (que permite la adquisición de los datos)
- Un ordenador que controla todo el equipo mediante el software Avalon suministrado por P.S.Analytical
- Gas portador: Argón de calidad C-50

CROMATÓGRAFO DE GASES (ACOPLAMIENTO GC-pyro-AFS)

Cromatógrafo de gases Varian modelo 3900 GC, provisto de:

- Bloque inyector CP-1177 de Varian, que permite división de flujo (split/splitless) y un control de flujo electrónico
- Inyector automático modelo CP-8410 de Varian
- Columna capilar de J&W Scientific (Agilent Technologies) de dimensiones 15 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno (tipo "narrowbore") y una fase estacionaria DB-5 (95 % dimetilpolisiloxano, 5 % fenilmetilsilicona) de 0,25 μm de espesor. Su rango útil de temperatura es -60 °C a 325 °C

- Gas portador: Helio de calidad C-50
- Detector de llama (FID), que requiere para su funcionamiento de dos gases: hidrógeno (suministrado por un generador de hidrógeno Alphagaz H₂ Flo de Air Liquide) y aire sintético de calidad C-45
- Software SAMS (Speciation Application Millenium Systems) de P.S.Analytical para la adquisición de la señal analítica al utilizar como detector el de fluorescencia atómica.

SISTEMA DE PIRÓLISIS TÉRMICA

Pirolizador diseñado y fabricado por Microbeam S.A. (España) que consta de un tubo de cuarzo introducido en una cámara de calentamiento controlada por un regulador de temperatura (regulador TH-7) que puede alcanzar temperaturas de hasta 1000 °C. Asimismo dispone de un rotámetro para controlar el caudal de gas (argón de calidad C-50).

SISTEMA ACOPLADO GC-ICP-MS

Sistema formado por un cromatógrafo de gases Focus GC de Thermo Finnigan, equipado con un inyector automático y una columna capilar MXT-1 (100 % de dimetilsiloxano) con unas dimensiones de 30 m x 0,53 mm de diámetro interno x 1,0 µm de relleno, que está conectado a un espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente X7 series de Thermo Electron Corporation (GC-ICP-MS). La conexión se realiza por medio de una interfase comercial suministrada por la compañía que consta de una línea de transferencia (capilar de silcosteel) que se inserta directamente en una antorcha especialmente diseñada para este propósito.

ESPECTROFOTÓMETRO DE ABSORCIÓN ATÓMICA

Espectrofotómetro de absorción-emisión atómica de Varian modelo SpectrAA 50 con atomización por llama aire-acetileno, lámparas de cátodo

huevo monoelemento y lámpara de deuterio como corrector de fondo, controlado por ordenador. El aire, suministrado por un compresor, es purificado y secado a través de un filtro apropiado que elimina el aceite, agua y otras sustancias extrañas. El acetileno es de calidad comercial estándar.

FOTÓMETRO DE ABSORCIÓN MOLECULAR UV-VISIBLE

Fotómetro ultravioleta-visible de Spectronic 20 D+ de un solo haz y lectura digital. Posee un filtro selectivo de la longitud de onda y un tubo fotomultiplicador como detector. Se utilizan cubetas de vidrio de 1,0 cm de espesor.

SISTEMA DE EXTRACCIÓN POR MICROONDAS

Sistema de extracción por microondas en recipientes cerrados Milestone ETHOS PLUS cuya potencia máxima es de 1000 w y que mediante el software Easywave (suministrado por el fabricante) permite realizar un control de presión y temperatura.

LIOFILIZADOR

Liofilizador Kinetics Flexi-dry modelo FD-1-84 D de FTS Systems, equipado con una bomba de vacío Telstar tipo 2P-3.

ANALIZADOR DE CARBONO Y NITRÓGENO TOTAL

Sistema analizador de carbono y nitrógeno total, modelo micro N/C de Analytic Jena.

ANALIZADOR DE PARTÍCULAS

Sistema analizador de partículas Coulter LS de Beckman Series Instrument, que permite medir el tamaño de distribución de las partículas de una determinada muestra de suelo.

POTENCIÓMETROS

- Potenciómetro digital Crison, modelo 2001, provisto de un electrodo combinado de vidrio y calomelanos saturado, que proporciona medidas con una sensibilidad de $\pm 0,01$ unidades de pH. En algunas de las medidas de pH realizadas, el electrodo del potenciómetro será reemplazado por un electrodo de semipila de pH modelo 422 Inlab de Mettler Toledo.
- Potenciómetro portátil modelo 704 pH de Metrohm provisto de un electrodo combinado de vidrio-Ag/AgCl y una sonda de temperatura.

CONDUCTIVÍMETROS

- Conductivímetro de laboratorio microCM 2200 de Crison, equipado con una célula de vidrio y platino ($K=1$) y un compensador automático de temperatura.
- Conductivímetro portátil de campo de Aqualytic.

BALANZAS

- Balanza analítica Sartorius modelo LA 230S con una precisión de ± 1 mg.
- Granatario Sartorius modelo TE 601 con una precisión de $\pm 0,1$ g.

CABINA DE FLUJO LAMINAR (CLASE 100)

Cabina de flujo laminar modelo LN 120 de Nüve equipada con una lámpara ultravioleta. Dispone de dos filtros: un pre-filtro que permite eliminar las partículas mayores de $0,5 \mu\text{m}$ y el filtro de alta eficacia para partículas mayores de $0,3 \mu\text{m}$.

UNIDAD EVAPORADORA

Unidad evaporadora Reacti-Vap modelo 18780 de Pierce acoplada a un módulo calefactor Reacti-Therm modelo 18790 de Pierce que permite concentrar nueve disoluciones no acuosas simultáneamente a través de una corriente de nitrógeno. La evaporación por medio de la corriente puede combinarse con un calentamiento regulado de las soluciones hasta una temperatura de 150 °C.

BAÑO DE ULTRASONIDOS

Baño de ultrasonidos modelo 3000513 de Selecta con regulador de tiempo de hasta 15 minutos.

CENTRÍFUGA

Centrífuga de motor de inducción de alta frecuencia de 9500 g (12.000 r.p.m.) modelo Centronic BL de Selecta en la que se pueden programar las variables de centrifugación. Dispone de un rotor modelo 7001443 que permite la introducción de 6 tubos cónicos de polietileno de 50 mL.

SISTEMA DE PURIFICACIÓN DE AGUA

Sistema de purificación de agua consistente en el acoplamiento de los equipos Purelab Option-R7/Purelab Ultra de ELGA (Vivendi Water Systems) que suministran agua purificada (resistividad 15,0 MΩ cm) y agua ultra pura (resistividad 18,2 MΩ cm).

AGITADOR DE TUBOS

Agitador vibrador de tubos o viales modelo 681 de Nahita.

PLACA CALEFACTORA

Placa calefactora rectangular Combiplac 3000718 de J.P. Selecta.

HORNO MUFLA

Horno mufla Heron 12-PR/200 serie 8B, que puede trabajar hasta una temperatura de 1200 °C.

ESTUFA

Estufa de convección natural para desecación y esterilización con termóstato de seguridad modelo Conterm 80 L de Selecta, que puede trabajar en el intervalo entre temperatura ambiente y 200 °C.

2.- LIMPIEZA DEL MATERIAL

La contaminación y las posibles pérdidas de analito son cuestiones críticas en la determinación de mercurio, ya que ésta se realiza siempre a niveles muy bajos de concentración debido a que su toxicidad se manifiesta incluso a dichas concentraciones. Entre las potenciales fuentes de contaminación se incluyen la limpieza inadecuada del material y aparatos de laboratorio y la contaminación general en el ambiente del laboratorio. Por ello, los análisis deben realizarse en un área limpia, diseñada para el manejo de muestras para análisis de elementos traza y todo el material de laboratorio que vaya a estar en contacto con la muestra debe limpiarse adecuadamente antes de su utilización.

En nuestro caso, todo el material utilizado (vidrio y teflón) fue lavado cuidadosamente antes de ser empleado. En primer lugar, se utilizó una solución jabonosa y se enjuagó convenientemente con agua primero y después con agua purificada. A continuación, se sumergió en una solución de ácido nítrico para limpieza (disolución acuosa de HNO_3 al 5 % v/v) durante al menos 24 horas. Posteriormente, el material se enjuagó abundantemente (al menos tres veces) con agua ultra pura doblemente desionizada por el equipo de purificación de agua. Por otro lado, el material empleado en la

preparación de disoluciones con disolventes orgánicos (microjeringas, viales) fue lavado secuencialmente con tres disolventes: acetona, diclorometano y hexano y posteriormente se procedió a su secado. En ocasiones, también fue necesario recurrir al baño de ultrasonidos para limpiar cierto material de vidrio como algunos de los componentes internos del cromatógrafo (liner) utilizando para ello el correspondiente ácido o disolvente.

Por su parte, el material empleado en la toma de muestras de agua fue lavado más escrupulosamente para evitar cualquier posible fuente de contaminación. Así, los recipientes de vidrio utilizados fueron lavados previamente con una solución jabonosa y enjuagados con agua desionizada pero a continuación fueron introducidos en sendos baños de HNO_3 y HCl al 10 % v/v estando sumergidos en cada uno de dichos baños durante al menos 72 horas. Transcurrido ese tiempo los recipientes fueron bien enjuagados (al menos tres veces) con agua ultra pura doblemente desionizada y finalmente se secaron en el interior de una cabina de flujo laminar de clase 100.

En cuanto a las conexiones del sistema FI-CV-AFS, éstas fueron limpiadas diariamente pasando por ellas ácido nítrico o ácido clorhídrico al 1 % v/v, agua y por último aire para que quedaran perfectamente secas. Cuando se observaron en los análisis problemas de contaminación se recurrió también a hacer una limpieza utilizando una solución diluida de oro preparada a partir de un patrón $1025 \mu\text{g mL}^{-1}$ de oro en HCl al 5 % m/v para absorción atómica suministrado por Aldrich Chemical Company Inc. (Milwaukee, USA).

3.- TOMA, TRATAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las fuentes de error en la etapa de muestreo pueden ser importantes como consecuencia de las bajas concentraciones en las que se encuentra el mercurio en el medio ambiente. Por tanto, la etapa de toma de muestra, al

igual que otras etapas del proceso analítico, conlleva la posibilidad de introducir errores sistemáticos y aleatorios en los resultados finales que pueden llegar a invalidar totalmente dicho proceso. Así pues, los errores sistemáticos deberían evitarse con una correcta planificación y ejecución de la toma de muestra, mientras que los errores aleatorios, inherentes a muestras heterogéneas y básicamente asociados a la falta de representatividad, deben minimizarse con una correcta estimación del tamaño y número de porciones tomadas del lote de muestra inicial. Por todo ello, la toma de muestra se ha de realizar evitando la contaminación de la muestra, preservando las formas y compuestos químicos y seleccionando un número o una masa de muestra relevante en función de la homogeneidad de la muestra y de la concentración de analito, para poder así evaluar el error asociado y poder controlar la calidad del proceso (1).

Debido a la alta volatilidad del mercurio, existe el riesgo de que se produzcan reacciones de intercambio, es decir, de adsorción y desorción sobre las paredes de los recipientes de muestreo y de reacción. Por lo tanto, como el vapor de mercurio puede difundirse a través de diferentes materiales plásticos, este fenómeno ha de tenerse en consideración en la elección del material para el almacenamiento y procesado de las muestras. Así, se recomienda utilizar recipientes de vidrio borosilicatado, politetrafluoroetileno (PTFE), perfluoro etileno-propileno (FEP) o cuarzo (2).

Además, en muchos casos es necesario añadir agentes conservantes para prevenir la degradación de las especies antes del análisis ya que durante el almacenamiento de la muestra se puede alterar la concentración y la forma original del analito no sólo como consecuencia de interacciones químicas entre especies o con el material del recipiente sino también por otros factores como la acción microbiana, la temperatura, el pH, la luz, etc. (3). Esto conlleva que la mayor parte de las muestras de origen biológico o medioambiental requieran el análisis inmediato o el almacenamiento a bajas temperaturas, con el fin de evitar la degradación de ciertas especies.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que algunos procesos llevados a cabo para mejorar la homogeneidad y el almacenamiento de las muestras como es el caso de la liofilización, pueden constituir un riesgo en muestras biológicas debido a la posibilidad de pérdidas de volátiles, así como a la degradación de proteínas asociadas a metales.

3.1 MUESTRAS DE AGUA

La toma de muestras de agua se realizó utilizando un dispositivo que permite abrir el frasco a un nivel determinado, siempre a una cierta distancia del fondo y de la superficie, evitando poner en suspensión los depósitos sedimentados. De cada punto de muestreo se tomaron dos muestras de agua en envases similares, una para los análisis de metales a la que se le añadió HCl ultrapuro concentrado como conservante (1 % v/v) y otra para el resto de las determinaciones que no fue acidificada. Los recipientes seleccionados para realizar la toma de muestra (botellas de vidrio color topacio) fueron previamente lavados según el procedimiento descrito anteriormente. No obstante, en el momento de la toma los recipientes fueron nuevamente enjuagados tres veces con el agua a analizar y después llenados.

Una vez en el laboratorio, se filtran unos 500 mL de la muestra de agua sin acidificar a través de una membrana de teflón tipo FH de Millipore de un diámetro de 47 mm y 0,45 μm de poro, previamente limpiada con ácido clorhídrico al 1 % y pesada, ya que se realizarán determinaciones tanto en la muestra filtrada como en el filtro.

Teniendo en cuenta que cuanto menor sea el tiempo que transcurre desde la toma de muestra hasta su análisis más fiable será el resultado, los análisis se realizarán en el menor tiempo posible conservando hasta entonces las muestras a 4 °C. No obstante, ciertos parámetros como pH, conductividad y temperatura fueron medidos *in situ* en el momento de la toma de muestra.

3.2 MUESTRAS DE SEDIMENTOS

Las muestras de sedimentos fueron tomadas generalmente utilizando una pala de plástico, previamente lavada con ácido y enjuagada, procurando remover sólo la parte superficial del sedimento. Sin embargo, en aquellos puntos de muestreo más inaccesibles hubo que utilizar una draga para poder tomar las muestras (*figura 2.1*). Dicha draga consistió en un dispositivo de dos piezas metálicas unidas y estaba diseñada de forma que cuando era lanzada al fondo del río se abría y al subirla se cerraba recogiendo los primeros centímetros del suelo.



Figura 2.1. Draga tipo Petersen utilizada para la toma de sedimentos

Una vez recogidas, las muestras se guardaron en frío en bolsas de cierre hermético convenientemente etiquetadas para su posterior transporte al laboratorio.

La preparación de las muestras de sedimentos para su análisis conllevó las siguientes operaciones:

- *Secado*: Los análisis de suelos, excepto la determinación de monometilmercurio, se realizarán sobre “muestra secada al aire”. Por este motivo, el secado se llevó a cabo a temperatura ambiente para evitar transformaciones irreversibles tales como pérdidas de volátiles,

que podrían tener lugar si éste fuera más drástico. Para ello, la muestra se extendió sobre una superficie no absorbente en una habitación ventilada y a temperatura ambiente.

- *Tamizado:* Tras el secado al aire, se tomó la muestra y se separaron las piedras, se rompieron los agregados con un rodillo y finalmente se pasó a través de un tamiz de 2 mm ya que la mayor parte de las determinaciones se llevarán a cabo sobre la fracción fina ($\varnothing < 2$ mm).
- *Molienda:* Este proceso se realizó sobre una fracción de la tierra fina utilizando un mortero de ágata de bolas. Su finalidad es obtener una gran homogeneidad del material para aquellas determinaciones que precisen trabajar con cantidades muy pequeñas de muestra, tales como la materia orgánica total o análisis elemental.
- *Almacenado:* La fracción de tierra fina una vez pulverizada se conservó en un recipiente cerrado y en un lugar fresco y seco.

Para obtener alícuotas lo más representativas posibles, a la hora de realizar los análisis se obtuvieron submuestras de las originales mediante el procedimiento de cuarteo.

En el caso de la porción de cada uno de los sedimentos destinada a la determinación de monometilmercurio, la etapa de secado fue sustituida por una de *liofilización* que consistió en el secado a vacío de las muestras a baja temperatura durante aproximadamente 8 horas. Las muestras a liofilizar fueron previamente tamizadas en húmedo a través de un tamiz de 2 mm.

3.3 MUESTRAS DE BIVALVOS

Las muestras de bivalvos recogidas en uno de los puntos del embalse de la Serena son de la especie *Unio pictorum* pertenecientes a la familia

Unionidae (figura 2.2), según fueron identificadas por el Museo Nacional de Ciencias Naturales del Consejo Superior de Investigaciones de Madrid.



Figura 2.2. Bivalvos de la especie Unio pictorum

Una vez recogidas las muestras, éstas fueron trasladadas al laboratorio en bolsas de polietileno etiquetadas, donde fueron almacenadas a -20 °C. La preparación de las muestras de bivalvos para su análisis consistió en una etapa previa de descongelación y de limpieza de las conchas antes de ser abiertas, para eliminar cualquier contaminación extraña. Los cuerpos de los bivalvos fueron separados de las conchas y triturados. Posteriormente, dichas porciones fueron liofilizadas durante 8 horas. En algunos casos tras triturar la muestra liofilizada fue necesaria una nueva etapa de liofilización durante un período de 3-6 horas. Finalmente, las muestras fueron homogeneizadas hasta obtener un polvo y se guardaron en viales de vidrio a -20 °C.

3.4 MUESTRAS DE PECES

Las muestras de peces fueron tomadas en uno de los puntos de muestreo del río Valdeazogues mediante caña de pescar y son de dos especies diferentes: *Lepomis gibbosus* (percasol o pez sol) y *Micropterus salmoides* (black bass o perca americana) que pertenecen a la familia Centrarchidae (figura 2.3).



Figura 2.3. Fotografías de un percasol (*Lepomis gibbosus*) y un black bass (*Micropterus salmoides*)

Una vez recogidas las muestras, éstas fueron trasladadas al laboratorio conservadas en frío en bolsas de polietileno etiquetadas, donde fueron almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Una vez pesados y medidos, se procedió a extraer el músculo que era nuestro órgano de interés. Para ello los peces fueron diseccionados con bisturís de acero inoxidable y una vez extraído cuidadosamente el músculo éste fue triturado. A continuación dichas porciones fueron liofilizadas durante un tiempo tal que la muestra quedara libre de toda el agua. Finalmente, las muestras fueron homogeneizadas en un mortero hasta obtener un polvo y se conservaron en viales de vidrio a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.- REACTIVOS Y ESTÁNDARES PARA ANÁLISIS DE MERCURIO

Puesto que los reactivos y el agua pueden contener trazas de mercurio como impureza, para lograr una alta sensibilidad en los análisis todas las disoluciones acuosas fueron preparadas con agua ultra pura doblemente desionizada (resistividad $18,2\text{ M}\Omega\text{ cm}$) y se utilizaron reactivos suprapuros o con un contenido especialmente bajo en mercurio. Por ello los ácidos nítrico y clorhídrico concentrados utilizados fueron de calidad

analítica y con bajos contenidos en metales pesados (máximo 0,005 mg L⁻¹ y 0,001 mg L⁻¹ de Hg respectivamente), suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania). Asimismo, los disolventes orgánicos utilizados para la especiación también fueron de calidad analítica, siendo el isooctano, el diclorometano y el hexano suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania), mientras que la acetona y el metanol fueron suministrados por PANREAC Química S.A. (Barcelona, España).

A continuación se indican los reactivos y estándares que fueron necesarios para realizar cada una de las determinaciones de mercurio que van a desarrollarse en la parte experimental:

DETERMINACIÓN DE CONTENIDOS TOTALES DE MERCURIO

- ❖ *Cloruro estannoso 2 % m/v*: Disolver 10 g de cloruro de estaño dihidratado con 50 mL de ácido clorhídrico concentrado (37 %) y llevar hasta 500 mL con agua desionizada. Para eliminar las posibles trazas de mercurio, burbujear la disolución con argón durante 15 minutos a un caudal de 2 litros por minuto. (Debe prepararse diariamente).
- ❖ *Bromato de potasio 0,033 M*: Disolver 1,39 g de bromato de potasio (previamente purificado por calefacción en un horno mufla a 250 °C) en 250 mL de agua. (Esta disolución ha de ser preparada semanalmente).
- ❖ *Bromuro de potasio 0,2 M*: Disolver 5,95 g de bromuro de potasio (previamente purificado por calentamiento en un horno mufla a 300 °C) en 250 mL de agua. (Debe prepararse mensualmente).
- ❖ *Reactivo de bromuro de potasio - bromato de potasio*: Mezclar volúmenes iguales de las disoluciones de bromato de potasio 0,033 M y bromuro de potasio 0,2 M. (Esta mezcla debe ser preparada diariamente).

- ❖ *Solución madre de 1000 mg L⁻¹ de mercurio:* Disolver 0,1354 g de HgCl₂ en 20 mL de agua. Añadir 5 mL de ácido nítrico concentrado y diluir hasta 100 mL con agua desionizada. (Esta sal no debe secarse para aumentar su pureza ya que es altamente tóxica).
- ❖ *Solución intermedia de 10 mg L⁻¹ de mercurio:* Diluir 5 mL de la disolución madre anterior de 1000 mg L⁻¹ de mercurio en aproximadamente 100 mL de agua. Añadir 10 mL del reactivo mezcla de KBrO₃/KBr y 75 mL de HCl 33 % v/v. Llevar hasta 500 mL con agua desionizada. (Ha de ser preparada semanalmente).
- ❖ *Cloruro de hidroxilamina 12 % m/v:* Disolver 12 g de cloruro de hidroxilamina de alta pureza en aproximadamente 80 mL de agua y enrasar a continuación hasta 100 mL con agua desionizada. (Esta disolución debe ser preparada semanalmente).

ESPECIACIÓN DE COMPUESTOS DE MERCURIO

- ❖ *Hidróxido de tetrametilamonio 25 % m/m en metanol:* disolución suministrada por Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Alemania).
- ❖ *Tampón ácido acético/acetato sódico 0,1 M (pH=3,9):* Disolver 3,4 g de acetato sódico trihidratado en unos 225 mL de agua desionizada. Ajustar el pH de la disolución anterior añadiendo ácido acético glacial hasta que sea aproximadamente de 3,9. Enrasar hasta 250 mL con agua desionizada.
- ❖ *Tetraetilborato de sodio 0,3 % m/v:* Pesar 0,18 g de tetraetilborato de sodio en una atmósfera inerte de argón o nitrógeno. Disolver con 50 mL de agua desionizada.
- ❖ *Ácido nítrico 6 M:* Diluir 10,5 mL de ácido nítrico concentrado (65 %) con agua desionizada hasta un volumen de 25 mL.

- ❖ *Solución madre de 1000 mg L⁻¹ de CH₃Hg⁺*: Pesar 0,0233 g de CH₃HgCl y añadir 20 mL de metanol medidos exactamente para disolver la sal. (Preparar con precaución debido a la toxicidad de la sal tomando todas las medidas de seguridad necesarias: uso de guantes, mascarilla, etc.)
- ❖ *Solución intermedia de 10 mg L⁻¹ de CH₃Hg⁺*: Tomar 200 µL de la disolución madre anterior de 1000 mg L⁻¹ de CH₃Hg⁺ y añadir 1 mL de ácido nítrico 6 M. Llevar a un volumen de 20 mL añadiendo agua desionizada.
- ❖ *Solución intermedia de 100 µg L⁻¹ de CH₃Hg⁺*: Tomar 200 µL de la disolución intermedia anterior de 10 mg L⁻¹ de CH₃Hg⁺ y añadir 1 mL de ácido nítrico 6 M. Llevar a un volumen de 20 mL añadiendo agua desionizada
- ❖ *Solución intermedia de 100 µg L⁻¹ de Hg²⁺*: Diluir 2,5 µL de la disolución de 1000 mg L⁻¹ de Hg²⁺ con agua en un matraz aforado de 25 mL. (Preparar semanalmente).
- ❖ *Solución madre de 1000 mg L⁻¹ de (C₆H₅)₂Hg*: Pesar 0,0013 g de (C₆H₅)₂Hg y añadir 1 mL del correspondiente disolvente orgánico (isooctano, hexano, diclorometano). (Preparar con mucha precaución debido a la gran toxicidad de esta sal, tomando todas las medidas de seguridad necesarias).

5.- MÉTODOS DE ANÁLISIS QUÍMICO

Atendiendo a la bibliografía consultada (4-7), se seleccionaron los métodos de análisis que se desarrollan a continuación para la determinación de ciertos parámetros en diferentes tipos de muestras medioambientales (aguas y sedimentos) tomadas tanto en el embalse de La Serena como en el

río Valdezogues a su paso por la comarca de Almadén. Cabe señalar que los parámetros analizados no pretenden ofrecer un análisis químico exhaustivo de estas muestras sino simplemente conocer algunas características de dichas muestras que pueden ayudar en la comprensión de los resultados que se deriven de los análisis de mercurio.

5.1 AGUAS

5.1.1 TEMPERATURA Y pH

A una temperatura dada la intensidad del carácter ácido o básico de una solución viene dada por la actividad del ion hidrógeno o pH.

Procedimiento:

Las medidas de temperatura y pH se realizaron *in situ* utilizando un potenciómetro portátil modelo Hanna Checker 1 de Sigma Chemical Co.

5.1.2 CONDUCTIVIDAD

La conductividad se determinó por conductimetría directa, siendo una medida de la capacidad de una solución para transportar la corriente eléctrica. Esta capacidad depende de la presencia de iones y de su concentración total, de su movilidad, valencia y concentraciones relativas, así como de la temperatura de medición.

Procedimiento:

Las medidas de conductividad se tomaron *in situ* con un conductímetro portátil de campo de Aqualytic previamente calibrado con la disolución patrón correspondiente de cloruro potásico.

5.1.3 SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN Y SÓLIDOS DISUELTOS

Los residuos de material que quedan en un recipiente después de la evaporación de una muestra líquida y su consecutivo secado en estufa a una temperatura definida pueden considerarse como los “sólidos totales” de

dicha muestra. Estos sólidos totales incluyen los “sólidos en suspensión” o porción de sólidos totales retenida por un filtro y los “sólidos disueltos” o porción que atraviesa el filtro.

El tipo de soporte del filtro, el tamaño de poro, la porosidad, el área y el espesor del filtro, así como la naturaleza física y el tamaño de las partículas y la cantidad de material depositado en el filtro son los factores principales que afectan a la separación de los sólidos en suspensión y los disueltos.

Procedimiento:

Se filtran 100 mL de una muestra bien homogeneizada por un filtro de fibra de vidrio GF/C, que previamente ha sufrido un tratamiento de calor (1 hora a 110 °C en la estufa). Conocido su peso y el residuo que queda retenido en el mismo se vuelve a secar durante 1 hora a 110 °C. Después del secado se pesa de nuevo y el aumento de peso del filtro representa los sólidos totales en suspensión expresados como mg de sólidos en suspensión por litro de agua filtrada.

El volumen de agua filtrado se traspa a una cápsula de evaporación de porcelana de 100 mL de capacidad y se evapora en una placa calefactora. La cápsula previamente debe haber sufrido el mismo tratamiento de calor que los filtros y haber sido pesada. Una vez evaporada toda la muestra, la cápsula se seca de nuevo durante 1 hora a 110 °C en la estufa. Transcurrido ese tiempo se pesa la cápsula y la diferencia de peso representa los sólidos disueltos que se expresarán también en mg L⁻¹.

5.1.4 CARBONO ORGÁNICO TOTAL

El carbono orgánico de las aguas limpias y residuales corresponde a diversidad de compuestos orgánicos en varios estados de oxidación. Algunos de tales compuestos del carbono pueden ser sometidos a una oxidación posterior por procesos químicos o biológicos. Para determinar la cantidad de carbono orgánico, las moléculas orgánicas deben romperse en unidades de

carbono simples y ser convertidas en una forma molecular sencilla que pueda medirse de forma cuantitativa.

Procedimiento:

Se determina directamente inyectando 1,5 mL de muestra en un analizador micro N/C de Analytic Jena a una temperatura de 680 °C.

5.1.5 NITRÓGENO ORGÁNICO

El nitrógeno orgánico se define funcionalmente como nitrógeno ligado orgánicamente en el estado de oxidación trinegativo. No incluye, por tanto, a todos los compuestos orgánicos del nitrógeno. No obstante, el nitrógeno orgánico incluye productos naturales, como proteínas y péptidos, ácidos nucleicos y urea y numerosos materiales orgánicos sintéticos.

Procedimiento:

Se determina de la misma forma que el carbono orgánico total, es decir, inyectando directamente 1,5 mL de muestra en el analizador micro N/C a una temperatura de 680 °C.

5.1.6 CLOROFILA *a*

Un aspecto muy importante en el funcionamiento de los sistemas acuáticos es el relativo a su situación trófica puesto que un exceso de nutrientes puede ocasionar serios problemas en dichos ecosistemas. Por tanto, un desmesurado crecimiento de productores primarios puede llegar a ocasionar una importante variación en la concentración de oxígeno disuelto entre el día y la noche. Ésta es la razón por la que en los últimos años se viene realizando un control de la biomasa de productores primarios (básicamente algas), con objeto de conocer el verdadero estado trófico de los ríos y analizar los posibles problemas derivados.

Procedimiento:

Se filtra una cantidad determinada de muestra (300 mL en dos filtros de fibra de vidrio tipo GF/C de 47 mm de diámetro). Una vez filtrada, se

coloca el filtro sobre un papel secante y en la oscuridad durante 20 minutos. Con esto se pretende eliminar el agua y que ésta no diluya después el metanol y que la luz no degrade la clorofila. Transcurrido ese tiempo, se enrollan los filtros y se introduce en un tubo de centrifuga y se añaden 10 mL de metanol al 90 % con objeto de extraer la clorofila retenida en el filtro. Los tubos se tapan con parafina y se dejan en la oscuridad a 4 °C. A las 24 horas los tubos son centrifugados a 3000 r.p.m. (600 g) durante 15 minutos. Finalmente el extracto obtenido se mide en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 665 nm, tomando como blanco metanol al 90 %. La concentración de clorofila *a* expresada en µg L⁻¹ se calcula a través de la siguiente expresión:

$$\text{Clorofila } a \text{ (}\mu\text{g L}^{-1}\text{)} = \frac{13,9 * \text{volumen disuelto (mL)} * A}{\text{volumen de agua filtrado (L)} * b \text{ (cm)}}$$

Donde:

- A es la absorbancia medida a 665 nm
- b es la anchura de la cubeta o paso óptico expresado en cm

5.1.7 HIERRO Y MANGANESO

▪ Hierro

El hierro se puede encontrar en el agua bajo diferentes formas. En las condiciones habituales, es decir, para un pH comprendido entre 4,5 y 9, el hierro soluble está generalmente en estado ferroso. Si el medio es reductor, como ocurre en muchas aguas subterráneas, el hierro ferroso puede alcanzar cantidades elevadas. En ausencia de iones que formen complejos, el hierro férrico no es soluble de un modo significativo más que a pH inferiores a 4. Sin embargo, al exponerlo al aire o a agentes oxidantes, el hierro ferroso se oxida al estado férrico y puede hidrolizarse formando óxido férrico hidratado insoluble. Por todo ello, para obtener una correcta determinación del hierro total conviene tratar con ácido las muestras en el momento de la

toma para disolver el hierro y evitar la adsorción o depósito sobre las paredes del recipiente de la muestra.

- Manganeso

El manganeso presente en el agua puede encontrarse con valencias diferentes (II, III y IV), en estado soluble, en suspensión o en forma de complejo; su solubilidad depende del pH, del oxígeno disuelto y de la presencia de agentes complejantes.

El manganeso puede estar en una forma soluble en un agua neutra al principio de la toma de muestra, pero con el tiempo se oxida a un grado de oxidación más alto y precipita o llega a ser absorbido por las paredes del recipiente. Por este motivo, el manganeso se debería determinar inmediatamente después de la toma de muestra, pero cuando esto no sea posible, se puede determinar transcurrido un cierto tiempo si en el momento de la toma de muestra, ésta se acidifica con HNO_3 hasta un $\text{pH} < 2$.

Procedimiento:

Se analizaron por absorción atómica con llama aire-acetileno, mediante un espectrofotómetro de absorción-emisión atómica de Varian modelo SpectrAA 50, utilizando las lámparas correspondientes a cada elemento y seleccionando la longitud de onda de trabajo adecuada en cada caso, es decir, 248,3 y 279,5 nm para hierro y manganeso, respectivamente.

Se prepara una disolución intermedia de 10 mg L⁻¹ de hierro o manganeso a partir de la correspondiente disolución madre de 1000 mg L⁻¹. Se construye una curva de calibrado multielemento entre 0 y 1 mg L⁻¹ y se procede a medir las muestras previamente filtradas sin tener que realizar ninguna dilución.

5.1.8 MONOMETILMERCURIO MEDIANTE GC-ICP-MS

Debido a los bajos contenidos de monometilmercurio presentes normalmente en las aguas, que se encuentran en el orden de los pg L⁻¹, la determinación de monometilmercurio en aguas se llevó a cabo mediante

cromatografía de gases-espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (GC-ICP-MS). Además para realizar estos análisis es necesario preconcentrar al máximo los extractos antes de su inyección en el sistema. La preparación de las muestras se llevó a cabo siguiendo un protocolo optimizado para el análisis de aguas naturales con el mismo sistema GC-ICP-MS (8), en el que las muestras fueron derivatizadas usando tetrapropilborato de sodio ($\text{NaB}(\text{C}_3\text{H}_7)_4$) por lo que el monometilmercurio fue detectado en forma del correspondiente derivado propilado.

Procedimiento:

Se toman 100 mL de las muestras de agua sin filtrar y se ajusta el pH a 5,0 añadiendo 5 mL de tampón ácido acético/acetato sódico 0,1 M usando ácido clorhídrico y amoníaco concentrado, cuando fuera necesario. A continuación se adiciona 1 mL de isooctano y 0,5 mL de $\text{NaB}(\text{C}_3\text{H}_7)_4$ al 2,0 %. Se agita manualmente durante 5 minutos y se separan las fases consiguiendo así preconcentrar las muestras en un factor de 100 veces. Finalmente el extracto preconcentrado se inyecta en el sistema GC-ICP-MS y se analiza en las condiciones instrumentales indicadas en la *tabla 2.1*.

Tabla 2.1. Condiciones instrumentales del acoplamiento GC-ICP-MS

Cromatógrafo de gases	
Gas portador	He (25 mL min ⁻¹)
Gas de refuerzo	Ar (400 mL min ⁻¹)
Volumen de inyección	2 µL en modo splitless
Temperatura de inyección	250 °C
Programa de temperaturas	60 °C hasta 250 °C a 60 °C min ⁻¹
ICP-MS	
Potencia de Rf	1250 W
Temperatura de la interfase	280 °C
Corrientes de argón	Plasma: 15 L min ⁻¹
	Auxiliar: 0,9 L min ⁻¹
	Nebulizador: 0,45 L min ⁻¹
Tiempo de integración	30 ms

5.2 SEDIMENTOS

5.2.1 pH

El pH se determina por potenciometría directa mediante electrodo combinado de vidrio-Ag/AgCl. El pH medido es función de la dilución, entre otros factores. De entre las muchas relaciones suelo-agua se ha generalizado la 1:2,5.

Procedimiento:

Se pesan en un vaso de precipitados 10 g de suelo secado al aire y tamizado a 2 mm y se añaden 25 mL de agua desionizada. Se agita durante 10 minutos usando un agitador magnético y posteriormente se deja en reposo durante 30 minutos para que se equilibre la solución.

Se calibra el pH-metro, se agita la muestra preparada inmediatamente antes de la lectura y se introducen los electrodos tomando la lectura cuando ésta se haya estabilizado.

5.2.2 CONDUCTIVIDAD

Se denomina conductividad eléctrica de un extracto de suelo a la aptitud de éste para transmitir la corriente eléctrica. La conductividad va a depender de la actividad y tipo de iones disueltos y de la temperatura a la que se realice la medida. Así pues, para medir la conductividad se compara la resistencia eléctrica de la muestra y de una valorada de cloruro potásico a la misma temperatura y se refiere el resultado a 25 °C.

Procedimiento:

Se pesan en un vaso de precipitados 10 g de suelo secado al aire y tamizado a 2 mm y se añaden 25 mL de agua desionizada. Se agita durante 5 minutos usando un agitador magnético y posteriormente se deja en reposo durante 30 minutos para que se equilibre la solución.

Se calibra el conductímetro con la correspondiente disolución patrón de cloruro potásico. Se realiza la medida de conductividad

introduciendo la célula de conductividad en el líquido sobrenadante de la muestra. Además es necesario medir previamente la conductividad del agua desionizada utilizada para preparar la muestra ya que la conductividad correspondiente a la muestra viene dada por la diferencia entre las lecturas de la disolución del suelo y del agua:

$$C_{muestra} = C_{disolución\ suelo} - C_{agua}$$

5.2.3 HUMEDAD A 105 °C

El agua del suelo dejado al aire libre se equilibra con la humedad del ambiente, la muestra no libera toda su agua debido a fenómenos higroscópicos. Por tanto, para poder referir los resultados de todos los análisis a “peso de muestra seca” y disminuir así el error que podría suponer un distinto grado de humedad ambiente, se determina el porcentaje de humedad.

Procedimiento:

Inicialmente se limpian las cápsulas de porcelana que se utilizan para esta determinación y las determinaciones 5.2.4 y 5.2.5. Para ello se secan a 900 °C en la mufla. Una vez deshidratadas, las cápsulas pasan al desecador, donde se dejan enfriar, y se pesan a temperatura ambiente (M_1). A continuación, se introduce en la cápsula aproximadamente 1 g de muestra y se pesa exactamente el conjunto (M_2). Dicha cápsula se deseca durante 1 hora en una estufa regulada a 105 ± 5 °C y transcurrido ese tiempo se pasa al desecador, donde se deja enfriar, y se pesa nuevamente la cápsula (M_3). La diferencia entre las pesadas va a permitir calcular el porcentaje de humedad de la muestra:

$$Humedad (\%) = \frac{(M_2 - M_3)}{(M_2 - M_1)} \times 100$$

5.2.4 PÉRDIDAS A 500 °C

La pérdida por ignición del sedimento a 500 °C permite evaluar, de forma aproximada, el contenido en materia orgánica del mismo.

Procedimiento:

La cápsula con la muestra desecada a 105 °C se introduce en la mufla a 500 °C durante 3 horas. Transcurrido ese tiempo, se deja enfriar en el desecador y posteriormente se pesa el conjunto cápsula – muestra. La diferencia de pesada proporcionará el peso debido al carbono orgánico y así se podrá calcular el correspondiente porcentaje considerando que:

$$\text{Pérdidas a 500 °C (\%)} = \frac{(M_1 - M_2)}{M_1} \times 100$$

Donde:

- M_1 es la masa en gramos de la muestra inicial de sedimento secado previamente a 105 °C
- M_2 es la masa en gramos de la muestra calcinada a 500 °C

5.2.5 PÉRDIDAS A 900 °C

La pérdida por calcinación a 900 °C se puede relacionar con el contenido en carbonatos.

Procedimiento:

Partiendo de la muestra calcinada a 500 °C, se sigue el mismo procedimiento de calentamiento en mufla del apartado 5.2.4 pero a una temperatura de 900 °C. Posteriormente se vuelve a pesar la cápsula con la muestra calcinada y se calcula el peso y el porcentaje en carbono inorgánico.

5.2.6 DETERMINACIÓN DE LA TEXTURA

El suelo está constituido por partículas de muy diferente tamaño. Los tamaños de estas partículas minerales y la proporción relativa de los grupos

por tamaños, varían considerablemente entre los suelos, pero no se alteran fácilmente en un suelo determinado. Por lo tanto, conocer esta granulometría es esencial para cualquier estudio del mismo. Para clasificar a los constituyentes del suelo según su tamaño de partícula se han establecido muchas clasificaciones granulométricas. Básicamente todas aceptan los términos de grava, arena, limo y arcilla, pero difieren en los valores de los límites establecidos para definir cada clase. De todas estas escalas granulométricas, son la de Atterberg o Internacional de la International Union of Soil Science (IUSS) y la americana del United States Department of Agriculture (USDA) las más ampliamente utilizadas (*figura 2.4*).

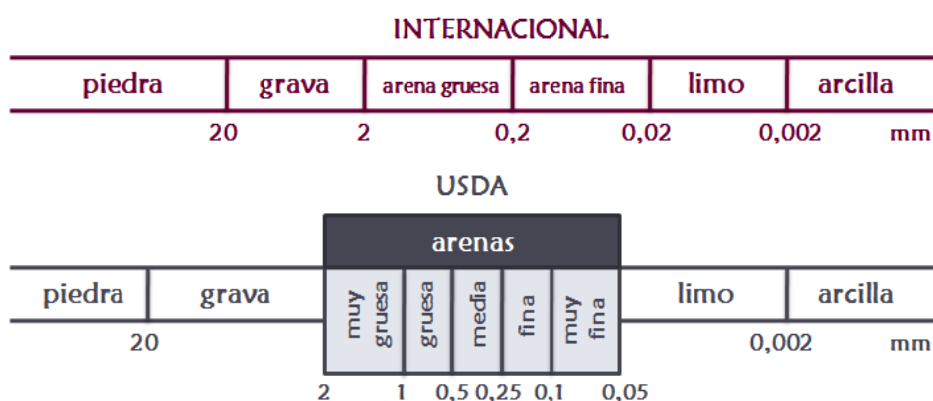


Figura 2.4. Escalas granulométricas internacional y del USDA

La textura representa la composición granulométrica del suelo. Cada término textural se corresponde con una determinada composición cuantitativa de arena, limo y arcilla. Así, en los términos de textura se prescinde de los contenidos en gravas ya que estos términos se refieren únicamente a la *tierra fina* o fracción del suelo que se estudia en los laboratorios de análisis. Los términos texturales se definen de una manera gráfica en un diagrama triangular que representa los valores de las tres fracciones. El diagrama textural correspondiente a la clasificación del USDA se reproduce en la *figura 2.5*.

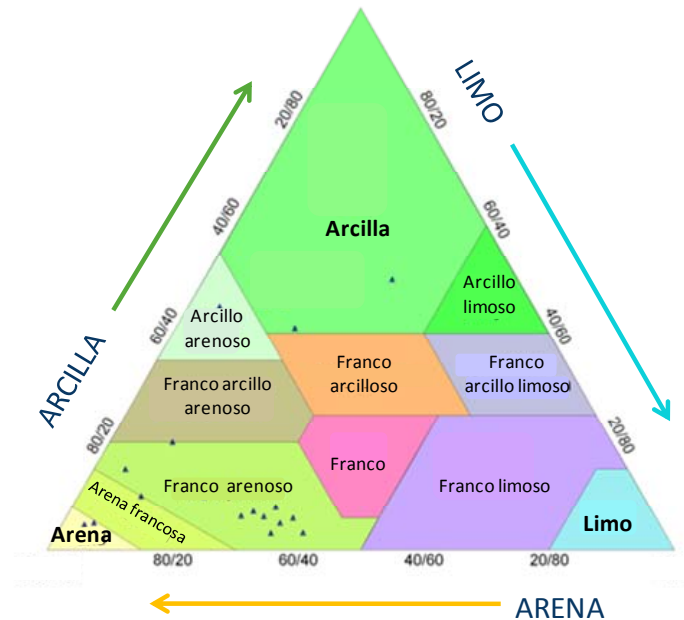


Figura 2.5. Diagrama de clasificación de texturas según el USDA (9)

Procedimiento:

Se toma una alícuota de la muestra previamente secada, pasada por un tamiz de 2 mm y homogeneizada cuidando de no romper los agregados para no alterar la distribución y se introduce en el sistema analizador de partículas Coulter LS de Beckman Series Instrument. Si los resultados de este análisis muestran un porcentaje muy alto de partículas mayores de 1 mm es conveniente analizar una nueva alícuota de la muestra pasada por un tamiz de 1 mm. Por tanto, se ha de pesar con exactitud la muestra antes y después de tamizar, lo que permite conocer el porcentaje de partículas mayores a 1 mm. Seguidamente, la muestra tamizada se introduce en el sistema analizador de partículas para poder determinar la distribución de las partículas menores a 1 mm. La clasificación de partículas del suelo se realiza finalmente según el “sistema americano” (USDA).

5.2.7 HIERRO Y MANGANESO

Para realizar la determinación del contenido en metales mediante absorción atómica es necesario realizar una etapa previa de ataque de la muestra sólida que puede ser por vía seca o por vía húmeda. La descomposición de los sedimentos se llevó a cabo mediante un proceso de digestión ácida por vía húmeda, utilizando extracción por microondas con recipientes cerrados. Las condiciones de extracción fueron las optimizadas al desarrollar el método de análisis para la determinación de mercurio total en sedimentos que se expondrán en la parte experimental. En los extractos resultantes se realizó la determinación de hierro y manganeso por absorción atómica.

Procedimiento:

1) Digestión de las muestras

En el recipiente de teflón para la digestión ácida se pesan 0,5 g de muestra, previamente pasada por un tamiz de 2 mm y molida en un mortero de ágata de bolas ($\varnothing < 200 \mu\text{m}$). Se añaden 9 mL de ácido clorhídrico 37 % y 3 mL de ácido nítrico 65 %. Se tapa este recipiente, se introduce dentro de las piezas exteriores del digestor y se cierra a presión. El conjunto del reactor se sitúa en el plato giratorio del microondas y se calienta durante 5 minutos para alcanzar una temperatura de 200 °C. A continuación se calienta otros 5 minutos para alcanzar la temperatura máxima de la rampa de 220 °C que se mantendrá durante 10 minutos y finalmente se dejan 15 minutos para su enfriamiento. Una vez enfriados los digestores se abren e inmediatamente se recogen los extractos en los correspondientes tubos para centrifugarlos y retirar así los residuos sólidos que quedaron tras la digestión. Se centrifuga a 4000 r.p.m. (1000 g) durante 10 minutos, repitiendo el proceso una vez tras resuspender el residuo sólido. El sobrenadante obtenido se transfiere a un matraz de vidrio donde se enrasa con agua ultrapura a 50 mL. (Aunque generalmente se obtiene una disolución limpia, si la disolución apareciera turbia será necesario filtrar para evitar que se produzcan obstrucciones).

2) Determinación por espectrofotometría de absorción atómica

El contenido en hierro y manganeso se analizó por absorción atómica con llama aire-acetileno, mediante un espectrofotómetro de absorción-emisión atómica de Varian modelo SpectrAA 50, al igual que para las muestras de agua. Se construye una curva de calibrado multielemento entre 0 y 1 mg L⁻¹ con el correspondiente contenido en ácido nítrico y clorhídrico (1:3) para igualar las condiciones de la muestra digerida. La intensidad de radiación absorbida por patrones y muestras se mide a la longitud de onda de trabajo correspondiente, 248,3 y 279,5 nm para hierro y manganeso, respectivamente. Finalmente, se calcula la concentración del metal en las muestras por referencia directa a la curva de calibrado.

6.- MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Todo estudio analítico debe sustentarse en un análisis estadístico que trate los datos para permitir su mejor comprensión. Las técnicas matemáticas que se han aplicado en la presente Memoria son mayoritariamente técnicas estadísticas elementales o básicas. No obstante, para la optimización de los métodos de análisis así como para la interpretación de resultados se utilizaron también otras herramientas estadísticas como son el diseño factorial de experimentos y los análisis de correlaciones y/o varianzas.

6.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO ELEMENTAL

El análisis estadístico elemental incluye una gran variedad de parámetros que van desde aquellos que tratan de evaluar la exactitud y la precisión de una determinación hasta los relacionados con los cálculos de rectas de regresión y límites de detección y cuantificación. De los utilizados en la presente Memoria, se va a hacer sólo una breve descripción puesto que son suficientemente conocidos (10-13).

6.1.1 PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS CLÁSICOS

- **Media aritmética:** es la suma de todas las medidas dividida por el número de determinaciones:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

- **Desviación estándar (s):** es la medida más utilizada de la variabilidad y se define por la fórmula:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

- **Varianza (s²):** es el cuadrado de la desviación estándar.
- **Coefficiente de variación (CV),** también conocido como *desviación estándar relativa*, cuyas unidades se expresan en porcentaje y viene definido por:

$$CV (\%) = 100 \frac{s}{\bar{x}}$$

- **Intervalo de confianza de la media:** indica en qué intervalo podemos decir que está incluido el valor verdadero, para un grado de confianza dado y, por tanto, vendría dado por la siguiente expresión:

$$\mu = \bar{x} \pm t \left(\frac{s}{\sqrt{n}} \right)$$

6.1.2 PROCEDIMIENTO ESTADÍSTICO PARA COMPARAR UNA MEDIA EXPERIMENTAL CON UN VALOR CONOCIDO

Se ha utilizado para comparar los resultados obtenidos en nuestros análisis con aquellos dados en los materiales de referencia y así comprobar si existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos a un nivel de significación dado, p . Estadísticamente se asume que el valor dado en el material de referencia es el valor real, μ . Cuando el número de muestras analizadas es $n < 30$, se calcula un valor de t sustituyendo los resultados experimentales en la siguiente ecuación:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{(\bar{x} - \mu)}{s/\sqrt{n}}$$

Si el valor de $t_{\text{calculado}}$ (en valor absoluto) es menor que un cierto valor crítico, que es el valor de t tabulado para $(n-1)$ grados de libertad y a un nivel de significación p , entonces se acepta la hipótesis nula. Esto es, se concluye que al nivel de significación escogido y con este tamaño muestral, no existen diferencias estadísticamente significativas entre el valor medio calculado y el valor verdadero, μ .

6.1.3 RECTAS DE CALIBRACIÓN

En las técnicas de análisis instrumental la concentración de una muestra no puede ser medida directamente, sino que es determinada a través de la medida de una cantidad física o señal, y . La condición para poder relacionar esta medida es que haya una relación empírica o teórica no ambigua entre ella y la concentración, x .

Así, el modelo de mínimos cuadrados es un modelo matemático que permite ajustar los puntos experimentales a una regresión lineal minimizando las desviaciones en la dirección de la y (ordenada). Este modelo encuentra la ecuación lineal que mejor se ajusta a este requisito y que será de la forma:

$$y = a + b x$$

donde a y b serán las correspondientes estimaciones de los parámetros denominados ordenada en el origen y pendiente, respectivamente.

En la práctica, para n pares de valores concretos (x_i, y_i) se daría la relación:

$$y_i = a + b x_i + e_i \quad (i=1, 2, \dots, n)$$

donde los valores e_i reciben el nombre de *residuos* y representan las diferencias entre los valores y_i observados y los valores y predichos por el modelo.

Por tanto, en todo proceso de calibración se considera la existencia de errores e_i en las respuestas y_i . Por el contrario, se considera que las variables independientes utilizadas en el establecimiento del modelo, x_i , están libres de error o éste es muy pequeño comparado con los residuos. Esta condición asume, por tanto, que los errores cometidos al preparar los patrones de calibración son significativamente más pequeños que los errores de medida.

Al calcular las estimaciones a y b por mínimos cuadrados se minimiza la suma de los cuadrados de los residuos de manera que se haya la mejor línea recta al minimizar la influencia de los errores, e_i :

$$\sum e_i^2 = \sum [y_i - (a + b x_i)]^2$$

Mediante la derivación de esta expresión respecto a a y b e igualando a cero, se obtienen las expresiones de la pendiente y la ordenada en el origen presentadas a continuación:

$$b = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum (x_i - \bar{x})^2}$$

$$a = \bar{y} - b \bar{x}$$

La recta de regresión calculada se utiliza para estimar la concentración de las muestras problema por interpolación. La precisión de la estimación depende del error de la medida de la muestra y del intervalo de confianza de la curva de calibración, lo cual está relacionado con la incertidumbre de las estimaciones a y b . A partir de las expresiones de la pendiente y la ordenada en el origen se pueden calcular sus desviaciones estándar, S_a y S_b , que vienen dadas por las expresiones siguientes:

$$S_a = S_{y/x} \left\{ \frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2} \right\}^{1/2} \quad S_b = \frac{S_{y/n}}{\{\sum (x_i - \bar{x})^2\}^{1/2}}$$

Donde $S_{y/x}$ es la estimación de la desviación estándar de los errores de las respuestas o residuos:

$$S_{y/x} = \left\{ \frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2} \right\}^{1/2}$$

siendo \hat{y}_i los valores de las respuestas calculadas de acuerdo con el modelo.

Para estimar si los puntos experimentales se ajustan bien o no al modelo propuesto de línea recta, se calcula el *coeficiente de correlación*, r , a pesar de que éste es un concepto definido para los métodos de correlación. Este parámetro es independiente de las escalas de medida escogidas y viene dado por la ecuación:

$$r = \frac{\sum [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\{[\sum (x_i - \bar{x})^2][\sum (y_i - \bar{y})^2]\}^{1/2}}$$

El coeficiente de correlación puede tomar valores entre -1 y +1. El máximo valor absoluto de correlación es uno y se encuentra cuando entre ambas variables existe una correlación perfecta. Aun cuando no existe correlación y la relación entre los datos es claramente de carácter no lineal, a el valor de r generará siempre un valor. Por este motivo es siempre necesario representar los puntos, porque de no ser del cálculo de r se puede deducir

erróneamente una relación de carácter lineal. Este coeficiente es válido para evaluar la linealidad en métodos de regresión porque está relacionado con el *coeficiente de regresión*, que es la pendiente, a través de las desviaciones estándares de las variables. De todos modos, habitualmente se calcula el *coeficiente de determinación*, r^2 , en lugar del coeficiente de regresión, puesto que r^2 en una recta de regresión tiene el significado de la parte de variación de y que es explicada por x .

6.1.4. COMPARACIÓN DE LAS PENDIENTES DE RECTAS DE CALIBRADO

Cuando tenemos dos pendientes empíricas, b_1 y b_2 , y se trata de decidir si son iguales o no, existe un test estadístico que nos permite realizar esta comparación.

En primer lugar, se ha de aplicar el test de la F para evaluar si las varianzas de las dos pendientes son iguales calculando un valor de $F_{\text{experimental}}$ que viene dado por la siguiente expresión:

$$F_{\text{experimental}} = \frac{(s_{b_1})^2}{(s_{b_2})^2}$$

Además hay que calcular una varianza estimada conjunta de las pendientes de las dos rectas de calibrado, $S_{b_{1,2}}^2$, a través de la ecuación:

$$S_{b_{1,2}}^2 = \frac{(n_1 - 2)(s_{b_1}^2) + (n_2 - 2)(s_{b_2}^2)}{n_1 + n_2 - 4}$$

Entonces, el valor experimental de F se compara con un valor teórico que es calculado para un número adecuado de grados de libertad ($n_1 - 1$ y $n_2 - 1$) a un nivel de confianza dado, α :

- Si $F_{\text{experimental}} < F_{\text{teórico}}$, entonces no hay una diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas estimadas de los residuos de ambas líneas y el test se realiza comparando el valor de $t_{\text{calculado}}$ con el valor de t_{tabulado} con $n_1 + n_2 - 4$ grados de libertad al nivel de significación elegido, siendo $t_{\text{calculado}}$:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{b_1 - b_2}{\left[S_{b_{1,2}}^2 \left(\frac{1}{\sum (x_{i_1} - \bar{x}_1)^2} + \frac{1}{\sum (x_{i_2} - \bar{x}_2)^2} \right) \right]^{1/2}}$$

⇒ Entonces si valor de $t_{\text{calculado}}$ es menor que el de t_{tabulado} se asume que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes de ambos calibrados.

- Si $F_{\text{experimental}} > F_{\text{teórico}}$, entonces sí existe una diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas estimadas de los residuos de ambas rectas por lo que el test se lleva a cabo calculando otro valor de t diferente (aproximación de Cochran):

$$t_{\text{calculado}} = \frac{b_1 - b_2}{(S_{b_1}^2 + S_{b_2}^2)^{1/2}}$$

que se comparará con el siguiente valor teórico de t :

$$t = \frac{t_1 S_{b_1}^2 + t_2 S_{b_2}^2}{S_{b_1}^2 + S_{b_2}^2}$$

donde t_1 y t_2 son los valores teóricos, obtenidos a partir de las tablas para un nivel de significación elegido y siendo n_1-1 y n_2-1 los grados de libertad respectivos.

⇒ Por tanto, si valor de $t_{\text{calculado}}$ es menor que el de t se considera que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes.

6.1.5. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

En términos generales, el *límite de detección (LD)* de un analito se puede describir como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento significativamente diferente de la señal de un blanco analítico. Mientras que el *límite de cuantificación (LC)*, también denominado límite de determinación, sería considerado como el límite inferior para medidas cuantitativas precisas. Debido a la ambigüedad de estas definiciones, éstas pueden ser interpretadas de diversas maneras lo que ha llevado a que existan diferentes métodos para calcular estos límites.

Según la IUPAC puede considerarse que “el límite de detección es aquella concentración que se deriva de la medida más pequeña (y_L) que puede ser detectada con una certeza razonable para un procedimiento analítico dado”. Así pues, la IUPAC describe el límite de detección en función de un nivel de certeza establecido por la expresión:

$$y_L = y_B + k s_B$$

donde y_B es el valor medio de la señal del blanco, s_B es su desviación estándar y k es un factor numérico escogido según el nivel de confianza deseado (la IUPAC recomienda un valor de $k=3$).

Si la señal del blanco analítico no difiere significativamente de la ordenada en el origen (a) de la recta de calibrado utilizada en la cuantificación, la expresión que define el **límite de detección** será la siguiente:

$$LD = \frac{y_B - a + k s_B}{b} = \frac{3s_B}{b}$$

donde b es la pendiente.

El **límite de cuantificación** se calcula en relación con el de detección considerando que:

$$LC = \frac{10}{3} LD = \frac{10s_B}{b}$$

Por tanto, según esta definición puede establecerse que el *límite de detección* es la concentración de analito que da una señal que es tres veces la desviación estándar del blanco (s_B), mientras que el *límite de cuantificación o determinación* se define como la concentración de analito que da lugar a una señal que es diez veces la desviación estándar del blanco.

Sin embargo, para ciertas técnicas de separación tales como la cromatografía o la electroforesis capilar, se han propuesto otros métodos para calcular los límites de detección y cuantificación en los que el cálculo se hace en relación con la fluctuación de la línea base. Evaluando el nivel del ruido de la línea base en una determinada zona del correspondiente cromatograma o electroferograma puede establecerse que el *límite de detección* es aquella concentración de compuesto que origina un pico con una altura que es tres veces la fluctuación de la línea base, mientras que el *límite de cuantificación o determinación* se vuelve a calcular como 10/3 el límite de detección por lo que correspondería a aquella concentración de compuesto cuya altura de pico equivale a diez veces la fluctuación de la línea base.

6.2 CONTRASTE DE HIPÓTESIS: TESTS ESTADÍSTICOS

Los tests estadísticos de hipótesis se utilizan para contrastar si los valores medios obtenidos para una serie de grupos de datos son realmente diferentes, es decir, si existe una causa subyacente que tiene algún sentido más allá de esos errores asociados con el uso de muestras o si dichas diferencias se deben simplemente a cuestiones del muestreo.

Los tests se basan en el cálculo de una distribución de muestras o de diferencias entre muestras. Éstas son distribuciones teóricas compuestas de todas las diferencias posibles entre medias del mismo tamaño que la muestra tomada, bajo la hipótesis nula de que no existen diferencias reales. La manera en que los tests generan esas distribuciones teóricas varía en cada caso y a veces implican complicadas fórmulas matemáticas (14).

El *nivel de significación* (p) es la probabilidad límite que se elige para rechazar la hipótesis nula, es decir, establece el grado de diferencia entre muestras que se pretende aceptar sin plantearse que la diferencia es demasiado extrema y que no podría obtenerse si ambas muestras proceden de la misma población.

La *región de rechazo* es la parte de la distribución de muestreo del test cuya probabilidad es menor o igual que el nivel de significación p .

Para calcular la distribución de muestreo de algunos tests hay que hacer ciertos supuestos sobre los datos (15):

1. Si los datos corresponden a una variable continua
2. Si la variable sigue una distribución normal
3. Si las varianzas de los subgrupos son similares u homogéneas
4. Si los datos son independientes

Cuando se cumplen todos esos supuestos, el test pertenece al grupo de los **tests paramétricos** que son muy potentes. Sin embargo, si los supuestos anteriores no se cumplen, los resultados que producen no serán fiables.

Por su parte, hay otro tipo de tests que no requieren el cumplimiento de los supuestos 1 y 3, son los denominados **tests no paramétricos**, que son casi o igual de potentes que los tests paramétricos en las situaciones en las que los datos no cumplen los supuestos 1 y 3. Además, son más robustos, es decir, cuando muestran diferencias significativas, están mejor fundadas y requieren también tamaños de muestra menores. Por lo tanto, cuando el tamaño de muestra es bajo (< 10) será preferible aplicar un test no paramétrico (15).

6.3 DISEÑOS EXPERIMENTALES

La optimización de un procedimiento experimental consiste en “el proceso de búsqueda y localización del conjunto de valores de las variables independientes que producen el mejor resultado posible en nuestro proceso de síntesis, medición o determinación analítica” (11). Tradicionalmente se ha utilizado una aproximación lógica para realizar dicha optimización que, aunque es aparentemente fácil de ejecutar, presenta en realidad muchos inconvenientes. Por ello, hoy en día, es frecuente recurrir a diseños de experimentos para tratar de optimizar algunos procedimientos analíticos.

Dentro de los diseños experimentales se puede distinguir entre aquellos que emplean estrategias simultáneas o secuenciales. Los diseños simultáneos, conocidos generalmente como diseños factoriales, permiten encontrar simultáneamente la relación entre respuestas y factores construyendo un modelo matemático e investigando dicha relación por medio de métodos de superficie de respuesta. Por otro lado, los diseños secuenciales de optimización se basan en un diseño inicial de experimentos al que le siguen una secuencia de medidas en dirección ascendente o descendente, por lo que no se evalúa una respuesta cuantitativa entre los factores (16).

Los *diseños factoriales* consisten en variar todos los factores simultáneamente en un número limitado de niveles factoriales. Ofrecen una gran cantidad de información a partir de un número muy pequeño de experimentos por lo que son un tipo de diseño experimental generalmente muy económico.

Para llevar a cabo un diseño factorial general de experimentos han de seleccionarse un número fijo de niveles (n) para cada una de las variables o factores (k). Esto permitirá después hacer experimentos con todas las posibles combinaciones. El número de experimentos que será necesario realizar viene definido por n^k , es decir, por una potencia en la que la base es el número de niveles asociado a cada factor y el exponente el número de factores a estudio (13).

A la hora de establecer los niveles correspondientes a los distintos valores de la variable a estudio dichos valores suelen ser codificados. Existen diversas maneras de realizar dicha codificación aunque habitualmente el nivel correspondiente al valor más alto se codifica como (+) ó (+1), mientras que la codificación equivalente para el nivel más bajo sería de (–) ó (–1) respectivamente. Cabe la posibilidad de que exista también un nivel central correspondiente a los valores intermedios el cual se codificaría como (0).

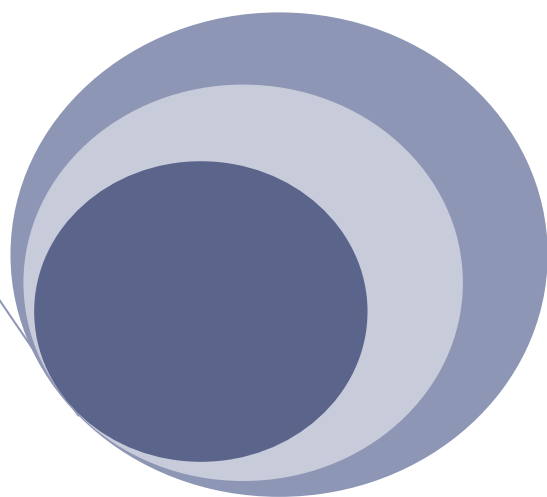
Los diseños factoriales más simples son los que implican dos factores y dos niveles que permiten definir principalmente modelos de primer orden. Sin embargo, existen también otros tipos más complejos que normalmente son aplicados a estudios en los que se relacionan dos factores y que suelen definir modelos de segundo orden o superior. Uno de estos diseños serían los denominados *diseños con punto estrella (star design)* en los que se llevan a cabo $2k+n_0$ combinaciones (siendo n_0 el número de experimentos en el centro del diseño). Por su parte, otros diseños aún más complejos serían los *diseños compuestos (composite design)* que provienen de la yuxtaposición de un diseño estrella y un diseño factorial de dos niveles, de manera que dan un total de 2^k+2k+n_0 combinaciones de factores posibles. Normalmente estos diseños se denominan *diseños compuestos centrales* ya que el punto central del diseño con punto estrella y el diseño factorial suelen coincidir.

Además de los anteriores diseños en los que se suelen establecer dos niveles, también existen diseños factoriales de tres niveles, que son conocidos como *diseños de superficies de respuesta*. Estos métodos de superficie de respuesta son muy útiles para cuantificar e interpretar la relación entre los efectos de los factores y su respuesta. De forma que esta superficie permitiría visualizar gráficamente como varios factores afectan al sistema de medida.

7.- BIBLIOGRAFÍA

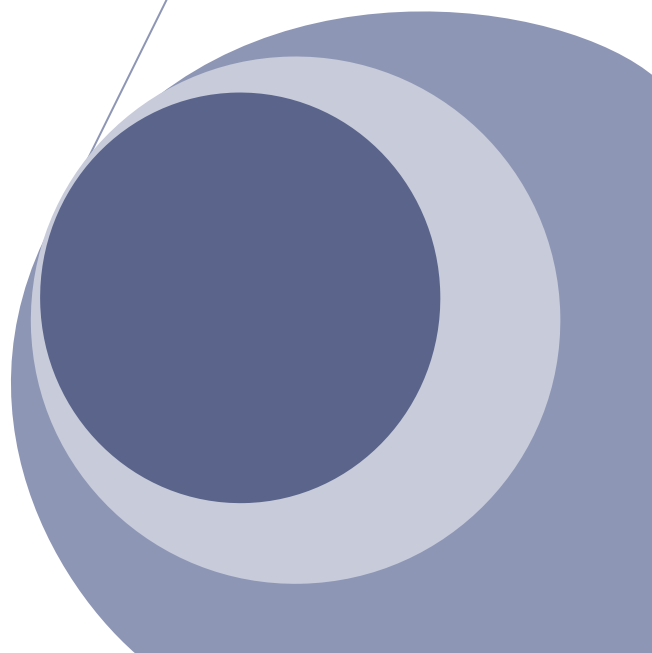
1. Cámara, C., Fernández, P., Martín-Esteban, A., Pérez-Conde, C., Vidal, M. *Toma y tratamiento de muestras*. Madrid: Ed. Síntesis, 2003.
2. AENOR. *Calidad del agua. Determinación del mercurio por espectrometría de fluorescencia atómica*. Norma Española UNE-EN 13506, 2002.
3. Gómez-Ariza, J.L., Morales, E., Sánchez-Rodas, D., Giráldez, I. Stability of chemical species in environmental matrices. *Trends in Analytical Chemistry*. 2000, Vol. 19, p. 200-209.
4. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Pollution Control Federation (WPCF). *Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales*. Washington: American Public Health Association, 1998. 20ª edición.
5. Hunt, D.T.E., Wilson, A.L. *The chemical analysis of water. General principles and techniques*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1986. 2nd edition.
6. Chapman, H.D. *Métodos de análisis para suelos, plantas y aguas*. México: Ed. Trillas, 1991.
7. Kim, H.T. *Soil Sampling, Preparation and Analysis*. New York: Ed. Marcel Dekker, Inc., 1996.
8. Monperrus, M., Tessier, E., Veschambre, S., Amouroux, D., Donard, O.F.X. Simultaneous speciation of mercury and butyltin compounds in natural waters and snow by propylation and species-specific isotope dilution mass spectrometry analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2005, Vol. 381, p. 854-862.
9. United States Department of Agriculture (USDA), Natural Resources Conservation Service. *Soil taxonomy: a basis system of soil classification for making and interpreting soil surveys*. Washington, 1999. 2nd edition.
10. Miller, J.C., Miller, J.N. *Estadística y quimiometría para Química Analítica*. Madrid: Ed. Prentice Hall, 2002.
11. Blanco, M., Roqué, R., Cela, R., Coello, J., Masport, S., Ortiz, M. C., Ribu, J., Rius, F. X., Sarabia, L. A., Tomas, X. *Avances en quimiometría práctica*. Santiago de Compostela: Servicio de publicaciones e intercambio científico de la Universidad de Santiago de Compostela, 1994.

12. **Box, G.E.P., Hunter, W.G., Hunter, J.S.** *Estadística para investigadores: introducción al diseño de experimentos, análisis de datos y construcción de modelos*. Barcelona: Ed. Reverté, 2005.
13. **Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., Deming, S.N., Michotte, Y., Kaufman, L.** *Chemometrics: a textbook*. Amsterdam: Ed. Elsevier, 2003.
14. **Snedecor, G.W., Cochran, W.G.** *Statistical methods*. Iowa State University Press, 1992.
15. **Pardo Merino, A., Ruiz Díaz, M.A.** *SPSS 11: Guía para el análisis de datos*. Madrid: Ed. Mc Graw Hill, 2002.
16. **Kellner, R., Mermet, J.M., Otto, M., Widner, H.M.** *Analytical Chemistry*. Weinheim: Ed. Wiley-VCH, 1998.



Capítulo III

Determinación de mercurio por FI-CV-AFS



1.- CONDICIONES DE MEDIDA DEL SISTEMA FI-CV-AFS

El sistema utilizado para la determinación de mercurio total en concentraciones de ultratrazas es un sistema de generación de vapor frío con detección por fluorescencia atómica (FI-CV-AFS), ya descrito en el capítulo anterior. Un diagrama esquemático del funcionamiento de este sistema aparece representado en la *figura 3.1*.

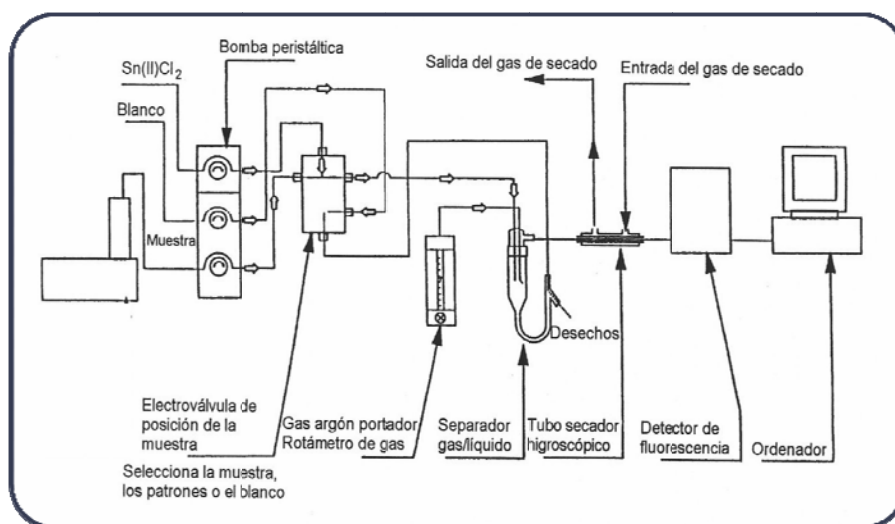


Figura 3.1. Diagrama del funcionamiento del sistema FI-CV-AFS
(Millenium Merlin)

En dicho sistema el generador de vapor en flujo continuo contiene dos bombas peristálticas de velocidad constante, una de ellas para el aporte del reductor y la otra para la muestra y el blanco de reactivos (que debe contener los mismos reactivos y en las mismas cantidades que la muestra que se va a analizar). Esta última bomba dispone de una válvula conmutadora que alterna entre el blanco y la muestra o las soluciones patrón, de forma que la señal medida está directamente relacionada con los niveles de mercurio en la muestra. Como disolución reductora se utiliza cloruro de estaño (II) ya que produce menos turbulencias en la corriente gaseosa que el NaBH_4 , además de no generar hidrógeno que produciría interferencias. Todo

ello conlleva una línea base mucho más estable mejorándose así la relación señal/ruido (1, 2).

Una vez impulsada la muestra por la bomba peristáltica y añadida la disolución reductora en medio ácido, se introduce el gas inerte (argón). De esta forma, el mercurio elemental generado por la reducción se transfiere de la fase líquida a la gaseosa en el separador de fases gas-líquido. A continuación, la fase gaseosa se conduce hacia una membrana higroscópica de Nafion®, donde se eliminan los restos de vapor de agua que queden en el gas, para evitar el atenuamiento que la humedad podría producir sobre la señal analítica. Finalmente, la corriente de gas seco, portadora del mercurio en su forma elemental, llega al detector de fluorescencia atómica, para su detección y cuantificación.

Los parámetros instrumentales del equipo establecidos inicialmente fueron, en la mayoría de los casos, los recomendados por el fabricante. No obstante, algunos de estos parámetros pueden ser optimizados y otros han de ser verificados periódicamente tal y como se indica a continuación.

- **Longitudes de los conductos:** Todos los tubos y conexiones existentes entre el muestreador, el generador de vapor y el detector deben ser verificados diariamente ya que en todo momento deben encontrarse en perfecto estado y de no ser así han de ser reemplazados. Pese a que la reacción de reducción se produce instantáneamente, la longitud de los tubos puede tener cierta influencia en los resultados obtenidos ya que en estos conductos se pueden producir pérdidas por adsorción o permeación del mercurio. Por ello, para mejorar la sensibilidad del sistema de medida se optó por utilizar líneas de conexión tan cortas como fuera posible.
- **Caudales de flujo de las bombas:** Los caudales de flujo deben ser también comprobados diariamente. Para ello se ha de poner en marcha la bomba y se debe verificar que las tres líneas (reductor, blanco y muestra) funcionan correctamente y que la relación de

flujos entre la línea del reductor y las de blanco/muestra se mantiene (debe ser el doble para la línea blanco/muestra que para la línea del reductor).

- **Corrientes de gas:** La elección del gas utilizado es de gran importancia para evitar cualquier efecto de “quenching” sobre la señal y así alcanzar la máxima sensibilidad de esta técnica analítica. Por este motivo, suele elegirse el argón que no produce estos efectos. El nitrógeno o el aire también podrían ser utilizados como corrientes portadoras del AFS. Sin embargo, la sensibilidad de fluorescencia utilizando estos otros gases se ve reducida en un factor de 8 o incluso de 30 veces empleando aire o nitrógeno, respectivamente. Además hay que cuidar que el gas utilizado esté libre de contaminantes. En el sistema de medida se utilizan dos flujos de argón distintos: el principal y el auxiliar o envolvente. Además también existe una tercera corriente de argón que es la encargada de la eliminación de la humedad o secado.
 - *Flujo de argón principal (carrier gas):* tiene como función la de arrastrar el mercurio desde la corriente líquida al detector. El valor óptimo para este flujo será de 300 mL min^{-1} , puesto que con este valor se obtienen picos con una relación área/altura pequeña.
 - *Flujo de argón auxiliar o envolvente (shield gas):* Es el que se introduce directamente en la unidad de fluorescencia y su finalidad es el confinamiento de la corriente principal de analito en un entorno adecuado para la excitación de los átomos de mercurio. Su valor óptimo es también de 300 mL min^{-1} .
 - *Flujo de argón de secado (dryer gas):* Esta corriente de argón se utiliza para secar el vapor de mercurio de la muestra en su camino hacia el detector. En este caso podría utilizarse cualquier otro gas inerte diferente al argón con este propósito. El valor adecuado para este flujo es de $2,5 \text{ L min}^{-1}$.

Si la presión de argón suministrada es de aproximadamente 40 psi, entonces el equipo regula automáticamente este aporte de gas de manera que la presión en el interior del equipo sería de 30 psi que es la presión adecuada para que las diferentes corrientes de argón presenten los valores óptimos anteriormente indicados.

- **Intervalo de medida:** Al ajustar este parámetro se establece el intervalo de amplificación de la señal. A mayor intervalo mayor es la amplificación de la señal y, por consiguiente, se tiene una mayor sensibilidad por parte del detector de fluorescencia atómica. Por este motivo, este intervalo debe adaptarse a la concentración de la muestra a medir. Cuando las muestras sobrepasan la escala de medida determinada por el ajuste de este intervalo puede procederse de dos formas, realizando un nuevo análisis con una sensibilidad menor o bien diluyendo la muestra para que su concentración esté dentro del intervalo establecido. Los posibles valores para este parámetro son cuatro: 1, 10, 100 y 1000, utilizándose siempre en nuestro caso el valor de 1000 puesto que se pretende trabajar en condiciones de máxima sensibilidad.
- **Factor de filtro:** Este valor está relacionado con la adquisición de los datos ya que indica la densidad de puntos que se utiliza a la hora de representar la correspondiente señal analítica. En los análisis realizados por FI-CV-AFS normalmente el valor óptimo para el factor de filtro depende del intervalo de medida seleccionado, recomendándose el factor de 64 para el intervalo 1000, 32 para el intervalo 100 y de 16 para el intervalo 10.
- **Modo de medida:** El sistema dispone de tres posibles modos de medida: “Ratio”, “Reference” y “Emission”, pero el modo en el que deben realizarse las medidas es el de “Ratio” pues su uso compensa las posibles derivas de la lámpara. Por su parte, el modo “Reference” corresponde al fotodiodo que se encuentra enfrente de la lámpara y el modo “Emission” a la señal correspondiente al fotomultiplicador.

Finalmente los parámetros instrumentales característicos del sistema FI-CV-AFS seleccionados aparecen reflejados en la *tabla 3.1*.

Tabla 3.1. *Parámetros característicos del sistema FI-CV-AFS*

Caudal de flujo	
Bomba 1: Muestra y blanco	10 mL min ⁻¹
Bomba 2: Reductor (SnCl ₂)	5 mL min ⁻¹
Analizador de mercurio	
Fuente	Lámpara de mercurio
Línea analítica	254,0 nm
Sensibilidad	1000
Corriente de gas principal	300 mL min ⁻¹
Corriente de gas auxiliar	300 mL min ⁻¹
Corriente de gas de secado	2,5 L min ⁻¹
Características del detector	
Intervalo	1000
Factor de filtro	64
Modo de medida	Ratio

2.- DETERMINACIÓN DE MERCURIO TOTAL POR FI-CV-AFS

En las determinaciones de mercurio total por FI-CV-AFS, la calidad de los resultados obtenidos va a depender en gran medida de las etapas previas de la preparación de las muestras, presentando cada tipo de muestra una problemática diferente. Así, en el caso de las aguas es muy importante realizar un control de blancos debido a las bajas concentraciones de mercurio que contienen, mientras que, en el caso de las muestras sólidas, será también fundamental la etapa de extracción cuantitativa del elemento desde la

muestra sólida. Por tanto, es necesario optimizar independientemente las condiciones de medida para cada uno de los diferentes tipos de muestras medioambientales.

2.1 DETERMINACIÓN DE MERCURIO TOTAL EN AGUAS

Para la determinación de mercurio en aguas naturales es importante distinguir entre la fracción disuelta y la fracción particulada. Para ello, en primer lugar, se debe realizar una filtración de las aguas y posteriormente se han de analizar, de forma independiente, la muestra filtrada (fracción disuelta) y el filtro que contiene la fracción particulada. Esto permite evaluar tanto la distribución y transporte del mercurio como conocer las relaciones existentes entre los contenidos de mercurio y diferentes parámetros que pueden influir en la química de este metal en las aguas como las partículas en suspensión, el carbono orgánico disuelto o particulado, la salinidad, etc. De esta manera se puede comprobar que, en muchas ocasiones, dichos parámetros no se correlacionan de igual manera con el mercurio disuelto y particulado (3-6).

2.1.1 ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN PARTICULADA

Para determinar la concentración de mercurio en la fracción particulada de las aguas se debe realizar previamente una mineralización de las membranas que se han utilizado para filtrar dichas muestras, a fin de extraer el mercurio contenido en las partículas retenidas en el filtro. Estas digestiones se llevaron a cabo en un sistema de extracción por microondas (Milestone, Ethos Plus) utilizando recipientes cerrados. Atendiendo a la bibliografía consultada, se seleccionó como agente extractante una mezcla ácida $\text{HNO}_3\text{:HCl}$ (9:1 v/v) (3, 4). En cuanto al programa de temperaturas, en principio, se optó por el descrito en una aplicación para la digestión de filtros de celulosa por microondas (7), pese a que en esa aplicación se utiliza una mezcla ácida distinta como extractante.

Este programa comprende las siguientes etapas:

- Etapa 1: $T_{\text{ambiente}} - 180\text{ }^{\circ}\text{C}$ (5 minutos)
- Etapa 2: $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ (10 minutos)
- Etapa 3: $180\text{ }^{\circ}\text{C} - T_{\text{ambiente}}$ (15 minutos)

Dependiendo del material del que estén fabricados los filtros, éstos podrán descomponerse totalmente durante la digestión, quedarán parcialmente disgregados o no se verán prácticamente afectados por el proceso de calentamiento. Como tras la digestión se pretende obtener un extracto limpio y claro que contenga el mercurio extraído para su posterior análisis por FI-CV-AFS, es importante elegir unos filtros que, o bien se descompongan totalmente durante la mineralización o bien queden inalterados y puedan retirarse fácilmente del extracto tras la digestión. Por este motivo, fueron evaluados diferentes tipos de filtros aplicando las condiciones de extracción previamente descritas.

En primer lugar, se utilizaron filtros convencionales de fibra de vidrio Whatman tanto del tipo GF/C como GF/F, ambos de 47 mm de diámetro y $0,45\text{ }\mu\text{m}$. Estos filtros fueron desechados debido a que durante la digestión se disgregaban sólo parcialmente no obteniéndose un extracto limpio. A continuación, según lo descrito en algunos trabajos (4, 8) se consideró que podía ser una buena opción usar filtros de otro material como teflón o nylon. Por ello, se probaron las membranas Fluoropore (Millipore) de $0,5\text{ }\mu\text{m}$ pero estos filtros de teflón presentaron el inconveniente de ser hidrofóbicos. Por tanto, debían ser activados con un disolvente orgánico como acetona o metanol antes de su utilización lo que suponía un foco de contaminación para los blancos. Así pues, finalmente se emplearon membranas de teflón hidrofílicas tipo FH de Millipore de 47 mm de diámetro y $0,45\text{ }\mu\text{m}$. Éstas no se disgregaban durante la extracción lo que permitía la obtención de extractos limpios y claros sin necesidad de centrifugación pero se deformaban un poco durante el calentamiento lo que hizo pensar que quizá la temperatura máxima alcanzada durante la extracción era excesiva.

Con estos resultados, se decidió disminuir la temperatura máxima del programa de extracción manteniendo, sin embargo, los tiempos de las diferentes etapas. Se probaron temperaturas de 100, 120 y 150 °C observándose que en todos los casos la deformación de los filtros fue similar y menor a la que se producía al utilizar la temperatura de 180 °C. Se seleccionó, finalmente, la temperatura de 150 °C para asegurar una extracción completa del mercurio contenido en los filtros.

Por tanto, para la extracción de los filtros, éstos se introdujeron en digestores de teflón donde se les adicionó 9 mL de HNO₃ (65 %) y 1 mL de HCl (37 %) y posteriormente se les sometió al siguiente programa de temperaturas:

- Etapa 1: T_{ambiente} - 150 °C (5 minutos)
- Etapa 2: 150 °C (10 minutos)
- Etapa 3: 150 °C - T_{ambiente} (15 minutos)

En los análisis se utilizó la correspondiente recta de calibrado para realizar la cuantificación. Así se obtuvo una recta de calibrado cuya ecuación fue: $y = 8,029(\pm 16,344) + 5,954(\pm 0,318) \times (r^2=0,992)$. En cuanto a los límites de detección y cuantificación, éstos fueron de 22 y 74 ng g⁻¹ (ng de Hg por g de filtro), respectivamente. Por último, al igual que se hizo en el análisis de la fracción disuelta, la reproducibilidad del método se comprobó calculando el coeficiente de variación en la medida de los extractos de diez filtros blanco, obteniendo un porcentaje de desviación estándar relativa de 8,6 %.

2.1.2 ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN DISUELTA

La determinación de mercurio total por FI-CV-AFS en aguas filtradas se va a realizar mediante una reducción con cloruro de estaño (II) (disolución de SnCl₂ al 2 % m/v en HCl 3M). Para acondicionar las muestras para su posterior análisis se lleva a cabo una oxidación química con BrCl procediendo tal y como indica la norma UNE-EN-13506 (9).

El protocolo a seguir es el que se describe a continuación:

1. Se transfiere cuidadosamente una alícuota de la muestra (60-80 mL) a un matraz aforado de 100 mL.
2. Se añaden a continuación 15 mL de ácido clorhídrico 33 % v/v y 2 mL del reactivo de bromuro de potasio-bromato de potasio.
3. Se deja reposar la muestra durante unos 30 minutos y, antes de realizar el análisis, se adicionan 30 μ L de cloruro de hidroxilamina 12 % m/v para eliminar el exceso de oxidante, de manera que se observa como desaparece la coloración amarilla debida al bromo libre. Si dicha coloración no hubiera persistido transcurridos los 30 minutos se debe añadir 1 mL adicional de la mezcla de bromuro de potasio-bromato de potasio.
4. Se enrasa con agua hasta 100 mL.

La cuantificación de las muestras se realizó utilizando la correspondiente recta de calibrado por lo que es necesario calibrar el equipo en las condiciones óptimas de medida. El intervalo de concentraciones del calibrado fue de 5 a 100 ng L⁻¹ obteniéndose tras el ajuste por mínimos cuadrados una recta con un buen coeficiente de determinación ($r^2=0,992$) y cuya ecuación fue la siguiente: $y = -23,008(\pm 16,213) + 7,645(\pm 0,306) x$.

En cuanto a los límites de detección y cuantificación, éstos fueron calculados considerando la desviación estándar (s_B) de diez blancos y sus valores de 0,5 y 2 ng L⁻¹, respectivamente, indican la sensibilidad del método. Además, se comprobó la reproducibilidad del método de análisis calculando el coeficiente de variación (porcentaje de desviación estándar relativa) en la medida de un patrón de una concentración de mercurio de 25 ng L⁻¹ realizada diez veces consecutivas. El valor obtenido fue de un 5,0 % por lo que se confirma la validez del método de análisis.

2.2 DETERMINACIÓN DE MERCURIO TOTAL EN SEDIMENTOS

Para poder realizar análisis de mercurio en muestras sólidas, como son los sedimentos, es necesaria una etapa previa de preparación de la muestra consistente en una extracción del analito a determinar de la matriz sólida en la que se encuentra.

Las digestiones se llevaron a cabo de nuevo en un sistema de extracción por microondas (Milestone, Ethos Plus) utilizando recipientes cerrados. En cuanto a los agentes extractantes, atendiendo a la bibliografía (10-14), se optó por utilizar una mezcla de ácido clorhídrico y ácido nítrico concentrados (en proporción 3:1 v/v). Dicho método no logra la destrucción total de la matriz sólida lo cual no causa ningún inconveniente para la determinación de mercurio, pues para ello no es preciso romper toda la red de silicatos. Esto puede justificarse considerando que el mercurio por su gran radio iónico no entraría a formar parte de las redes de silicatos y, por lo tanto, no es necesario destruir la sílice para recuperar todo el mercurio presente en un suelo o sedimento (15). La mezcla de ácidos utilizada para la extracción (agua regia) debe estar recién preparada y utilizarse inmediatamente ya que, de lo contrario, se produce gas cloro que sobrepresuriza y abriría el recipiente digestor. Esto se debe a que el agua regia genera cloruro de nitrosilo que se descompone en NO y Cl₂.

Las cantidades de muestra y extractantes, así como el programa de temperaturas fueron seleccionados en base a una aplicación ya descrita para la digestión ácida de suelos por microondas (16). Estas cantidades fueron de 0,5 g de sedimento + 9 mL de HCl (37 %) + 3 mL de HNO₃ (65 %) y el programa de temperaturas aplicado fue el que se describe a continuación:

- Etapa 1: T_{ambiente} - 200 °C (10 minutos)
- Etapa 2: 200 °C (15 minutos)
- Etapa 3: 200 °C - T_{ambiente} (15 minutos)

Al no producirse una descomposición total del sedimento, tras la digestión fue necesario centrifugar el extracto obtenido. Esta centrifugación se realizó a 1000 g (4000 r.p.m.) durante 10 minutos. (En ocasiones hubo que repetir este proceso dos veces).

Los límites de detección y cuantificación de este método fueron de 19 y 64 ng g⁻¹, respectivamente, y la ecuación de la recta de calibrado empleada fue: $y = 7,999(\pm 6,414) + 7,396(\pm 0,136) \times$ ($r^2=0,999$). Mientras que el porcentaje de desviación estándar relativa fue 5,9 % (68 ng g⁻¹, $n=10$).

La exactitud del método de digestión ácida propuesto fue evaluada utilizando dos materiales de referencia certificados de interés medioambiental cuyas principales características aparecen descritas en la *tabla 3.2*.

Tabla 3.2. *Materiales de referencia certificados para la evaluación de la exactitud de métodos de análisis de metales en sedimentos*

Material de referencia	Tipo de material	[Hg] _{total} certificado \pm SD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Organismo certificador
GBW 07310	Sedimento de arroyo	0,280 \pm 0,018	National Research Centre for CRM's (China)
GBW 07311	Sedimento de arroyo	0,072 \pm 0,006	National Research Centre for CRM's (China)

Cuatro alícuotas independientes de cada material fueron mineralizadas siguiendo el método de digestión descrito y medidas por quintuplicado utilizando el sistema FI-CV-AFS. Los resultados obtenidos se muestran en la *tabla 3.3*, donde la aplicación del test estadístico correspondiente nos permitió comprobar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios determinados y aquellos certificados, al nivel de confianza escogido ($p=0,05$).

Tabla 3.3. Evaluación de la exactitud en la determinación de mercurio en sedimentos por FI-CV-AFS

Material de referencia	[Hg] _{total} ± SD (μg g ⁻¹)	
	Valor certificado	Valor encontrado
GBW 07310	0,280 ± 0,018	0,311 ± 0,026 (n=4)
GBW 07311	0,072 ± 0,006	0,064 ± 0,003 (n=4)

2.3 DETERMINACIÓN DE MERCURIO TOTAL EN MUESTRAS BIOLÓGICAS DE ORIGEN ANIMAL

Este apartado se va a centrar en la optimización de un método aplicable principalmente al análisis de muestras de la biota acuática, como peces y bivalvos. Estos organismos son los que presentan una mayor tendencia a bioacumular el mercurio que se encuentra en su entorno en el ambiente acuático. Para el tratamiento de este tipo de muestras biológicas se va a realizar una extracción mediante microondas que pretende una destrucción eficaz de la materia orgánica para que no suponga ninguna interferencia en la determinación posterior. Además, antes de la digestión, estas muestras tendrán que ser sometidas a un tratamiento de liofilización para eliminar el agua.

La optimización del método propuesto fue realizada utilizando varios materiales de referencia con contenidos certificados en mercurio que abarcan un gran intervalo de concentraciones para que, de esta manera, el método optimizado sea aplicable a una mayor variedad de muestras. Las principales características de los materiales de referencia que se emplearon aparecen en la *tabla 3.4*.

Tabla 3.4. Materiales de referencia certificados para la evaluación de la exactitud de métodos de análisis de mercurio en tejidos biológicos

Material de referencia	Tipo de material	[Hg] _{total} certificado ± SD (µg g ⁻¹)	Organismo certificador
GBW 08571	Tejido de mejillón	0,067 ± 0,008	National Research Centre for CRM's (China)
TORT-1	Hepatopáncreas de langosta	0,458 ^(*)	National Research Council of Canada
DOLT-3	Hígado de cazón	3,37 ± 0,14	National Research Council of Canada
DORM-2	Músculo de cazón	4,64 ± 0,26	National Research Council of Canada

(*): Valor calculado como suma a partir de los valores certificados para mercurio inorgánico y metilmercurio

Los diferentes parámetros que fue necesario optimizar pueden agruparse en: condiciones de extracción y condiciones de medida.

Dentro de las condiciones de extracción, utilizando el sistema de extracción en recipientes cerrados por microondas (Milestone, Ethos Plus), los principales parámetros que se estudiaron fueron la cantidad de muestra, el agente extractante y el programa de tiempos y temperaturas aplicado.

Como cantidad de muestra a digerir se eligió 0,2 gramos y dicha cantidad se mantuvo en todas las experiencias realizadas, independientemente de que se fueran variando en cada una de ellas diferentes parámetros que podían afectar a la extracción o al análisis posterior. Dicha cantidad fue seleccionada en base a la información encontrada en la bibliografía (17) y además se estimó que era suficiente para extraer una cantidad representativa de mercurio manteniendo las condiciones de seguridad del microondas.

Asimismo, atendiendo a la bibliografía consultada (17-21), se seleccionaron los programas de tiempos y temperaturas y los reactivos de extracción que fueron evaluados y que se reflejan en la *tabla 3.5*.

Tabla 3.5. Condiciones de extracción evaluadas en la optimización del método de digestión para la determinación de mercurio total en muestras biológicas

Programa de tiempos y temperaturas	Agentes extractantes
Programa I:	a) HNO_3
~ Etapa 1: $T_{\text{ambiente}} - 200\text{ }^{\circ}\text{C}$ (5 min.)	b) $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$
~ Etapa 2: $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ (5 min.)	i) $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$ (2,5:1 v/v)
~ Etapa 3: $200 - 220\text{ }^{\circ}\text{C}$ (5 min.)	- 1 sola digestión
~ Etapa 4: $220\text{ }^{\circ}\text{C}$ (5 min.)	- 2 digestiones sucesivas
~ Etapa 5: $220\text{ }^{\circ}\text{C} - T_{\text{ambiente}}$ (15 min.)	ii) $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$ (4:1 v/v)
Programa II:	
~ Etapa 1: $T_{\text{ambiente}} - 180\text{ }^{\circ}\text{C}$ (10 min.)	
~ Etapa 2: $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ (10 min.)	
~ Etapa 3: $180\text{ }^{\circ}\text{C} - T_{\text{ambiente}}$ (15 min.)	

En cuanto a los programas seleccionados, el *programa I* es el más energético de los dos propuestos y está descrito para la digestión ácida del material de referencia BCR 464 (tejido de atún liofilizado) (21). Mientras que el *programa II* es un programa menos energético que puede ser recomendable para evitar que se produzcan pérdidas de mercurio por difusión a través de las paredes de los recipientes digestores.

En lo que respecta a los reactivos de extracción se evaluaron dos de los agentes más empleados en las digestiones ácidas de este tipo de muestras, esto es, ácido nítrico y la mezcla de ácido nítrico con peróxido de hidrógeno.

Por otro lado, los factores que ejercen un mayor efecto en las condiciones de medida de este tipo de análisis son la concentración del agente reductor y el medio ácido en el que se realiza la medida de manera que ambos tuvieron que ser optimizados. En cuanto al cloruro de estaño (II) utilizado como reductor se estudiaron diferentes concentraciones comprendidas entre el 2 % y el 7 %. Mientras que como medio ácido de medida se evaluó tanto el empleo del medio utilizado para el análisis de aguas, es decir, un medio oxidante con BrCl, como el uso de un medio ácido nítrico más parecido al medio de extracción.

De todos los factores indicados anteriormente, uno de los más determinantes en la optimización del método fue el reactivo utilizado en la extracción. Por tanto, se van a describir los resultados obtenidos clasificándolos en función de este parámetro.

a) Digestión con HNO_3 (Condiciones I.a.)

En principio, según lo descrito en algunos trabajos (17), se consideró que el empleo en la extracción de ácido nítrico concentrado podía ser suficiente para destruir la materia orgánica y extraer el mercurio contenido en este tipo de muestras. Por ello, en primer lugar se evaluó el uso de este reactivo como agente extractante aplicando el *programa I* que es el más enérgico de los dos propuestos (21). Estas condiciones fueron evaluadas sobre los materiales de referencia GBW 08571 y TORT-1 con diferentes cantidades de extractante. Además, como en los análisis de este tipo de muestras puede haber pérdidas de señal debido a interferencias de la materia orgánica, se estudió el efecto que ejerce la concentración del reductor (SnCl_2) empleado.

En el caso del material GBW 08571 las recuperaciones obtenidas fueron inferiores al 80 % excepto para la extracción realizada con 10 mL de HNO_3 y utilizando SnCl_2 al 4 % en la medida donde fueron próximas al 100 %. Sin embargo, estas condiciones no pudieron ser confirmadas cuando se utilizó el material de referencia TORT-1 ya que, como se observa en la *figura 3.2*, se encontraron recuperaciones entre el 40 % y el 70 % para todas las condiciones ensayadas.

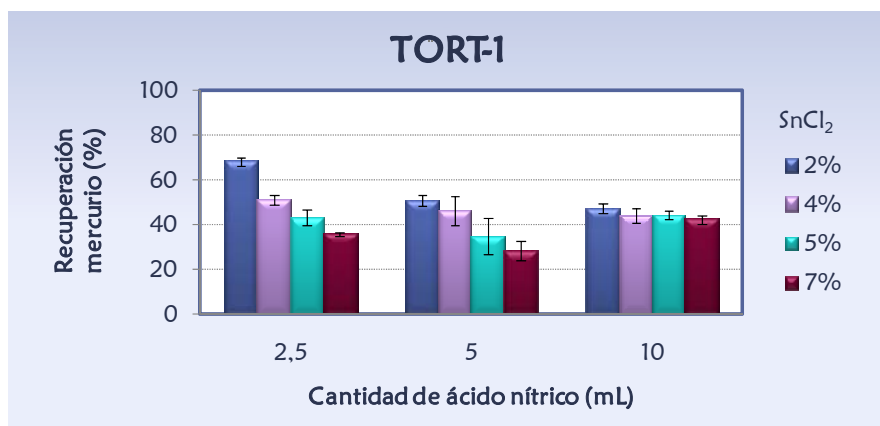


Figura 3.2. Evaluación de la extracción de mercurio con HNO_3 en el material de referencia TORT-1 usando diferentes concentraciones de SnCl_2

b) Digestión con HNO_3 y H_2O_2

Tras comprobar que la digestión con ácido nítrico no era suficiente se comprobó el efecto del peróxido de hidrógeno (30 % v/v). Éste es un agente oxidante que acelera la digestión de muestras orgánicas pues reduce los vapores nitrosos y eleva la temperatura. Así pues, faltaría evaluar la proporción en la que se han de mezclar ambos agentes. Por ello se probaron las dos proporciones entre estos dos reactivos que se indican a continuación:

i) Proporción 2,5:1 (v/v) (Condiciones I.b.i)

Esta proporción entre los agentes extractantes fue seleccionada de acuerdo con lo recogido en la bibliografía (18). Sin embargo, el problema que se encontró al realizar la extracción con 2,5 mL de HNO_3 (65 %) + 1 mL de H_2O_2 (30 %) y utilizando el *programa I*, fue que si se añadían los dos reactivos simultáneamente las muestras se calcinaban. Esto provocó que hubiera que realizar la extracción en dos fases, digiriendo en primer lugar la muestra con el ácido nítrico y adicionando, posteriormente, el peróxido de hidrógeno para realizar una segunda extracción, lo cual hacía más laborioso el proceso.

Al evaluar esta extracción aplicando dos veces consecutivas el *programa de digestión 1* (para evitar la calcinación de las muestras) se obtuvieron las recuperaciones que se muestran en la *figura 3.3*. En ella se observa como siguen sin obtenerse buenas recuperaciones de mercurio en los dos materiales evaluados (GBW 08571 y TORT-1) en diferentes condiciones de medida. Estas recuperaciones son menores del 70 % en todos los casos para el TORT-1. Mientras que para el GBW 08571 son inferiores al 80 %, excepto cuando se realiza la medida empleando cloruro estannoso al 4 % donde se obtiene una recuperación próxima al 90 %.

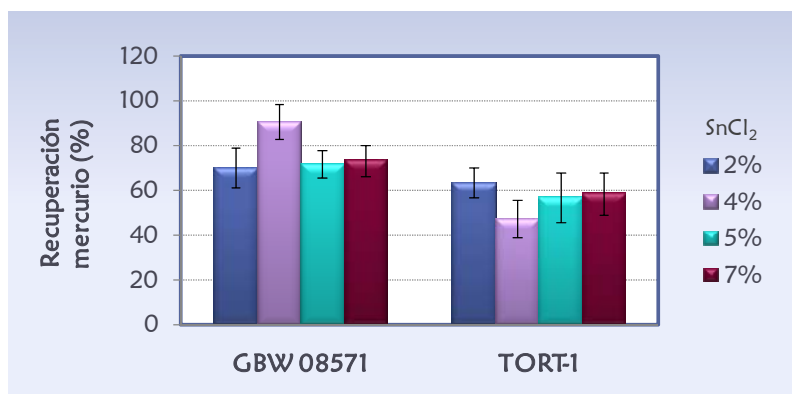


Figura 3.3. Evaluación de la extracción de mercurio con HNO₃ + H₂O₂ (2,5:1 v/v) en los materiales de referencia GBW 08571 y TORT-1 usando diferentes concentraciones de SnCl₂

Teniendo en cuenta tanto estos resultados como los obtenidos al realizar la extracción con ácido nítrico, se seleccionó una concentración de SnCl₂ al 4 % como concentración óptima del reductor. Por tanto, a partir de este momento ésta fue la concentración utilizada en el resto de análisis realizados para completar la optimización de este método.

ii) Proporción 4:1 (v/v)

El principal inconveniente que presentaba la relación de volúmenes anterior de los agentes extractantes (2,5:1 v/v) era el hecho de tener que

realizar la extracción en dos fases para evitar la calcinación de las muestras. Por ello se trató de encontrar una proporción que nos permitiera realizar el proceso en una sola fase. Así se encontró que la relación 4:1 (v/v) permitía la extracción en una sola etapa sin calcinación de las muestras. Las cantidades de cada uno de estos reactivos utilizadas fueron de 8,0 y 2,0 mL de ácido nítrico concentrado y peróxido de hidrógeno al 30 %, respectivamente.

En cuanto a las condiciones de medida, una vez fijada la concentración del reductor, en estos análisis se va a evaluar otro parámetro diferente como es el medio en el que se realiza la medida. Hasta el momento se habían realizado en un medio oxidante similar al que se empleaba en el análisis de aguas pues se pensaba que estas condiciones podrían facilitar la eliminación de las posibles interferencias derivadas de la presencia del elevado contenido en materia orgánica. Sin embargo, en estas condiciones de extracción se comprobó que el tratamiento de las muestras con estos reactivos originaba señales demasiado altas en los blancos de medida y se consideró más conveniente utilizar un medio ácido que fuera más parecido al medio de extracción. Por tanto, se decidió realizar las medidas en un medio ácido nítrico cuya concentración óptima también tuvo que ser estudiada.

Los resultados obtenidos al evaluar las nuevas condiciones de extracción anteriormente comentadas aplicando los dos programas de digestión son los que se describen a continuación:

- *Programa de digestión II (Condiciones II.b.ii)*

Como se refleja en la *figura 3.4* la concentración óptima para el medio ácido fue de un 2 % (v/v), es decir, que el medio debe contener 2,0 mL de ácido nítrico concentrado por cada 100 mL de disolución de extracto que vayamos a analizar. Además en dicha figura se observa también que con este método se alcanzan ya buenas recuperaciones para algunos de los materiales de referencia estudiados, pero no para todos ellos. Esto podría indicar que el programa de digestión aplicado no fuera suficientemente enérgico para todas las matrices estudiadas y por ello sería conveniente estudiar de nuevo el *programa I* en estas condiciones.

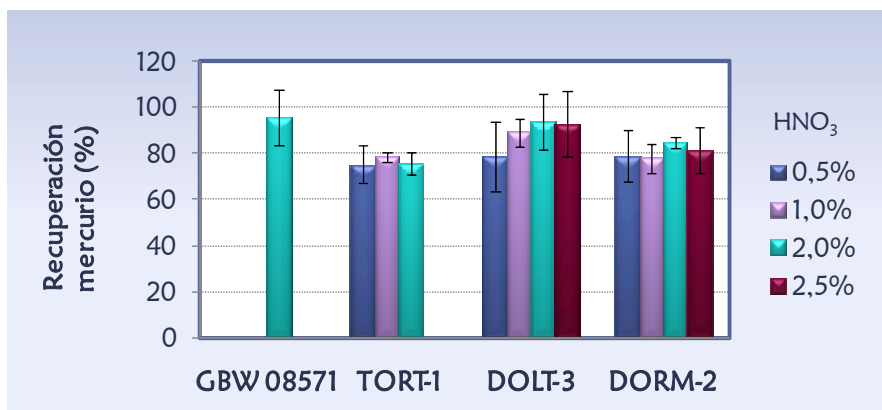


Figura 3.4. Evaluación de la extracción de mercurio con $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$ (4:1 v/v) en diferentes materiales de referencia biológicos en función de la concentración del medio ácido de medida

- **Programa de digestión I (Condiciones I.b.ii)**

Como se observa en la *figura 3.5*, al aplicar este programa de extracción para digerir 0,2 gramos de muestra utilizando como reactivos de extracción 2 mL de HNO_3 (65 %) y 8 mL de H_2O_2 (30 %) y midiendo según las condiciones óptimas de análisis (SnCl_2 al 4 % y medio ácido de HNO_3 al 2 %), se obtuvieron buenas recuperaciones en todos los casos.

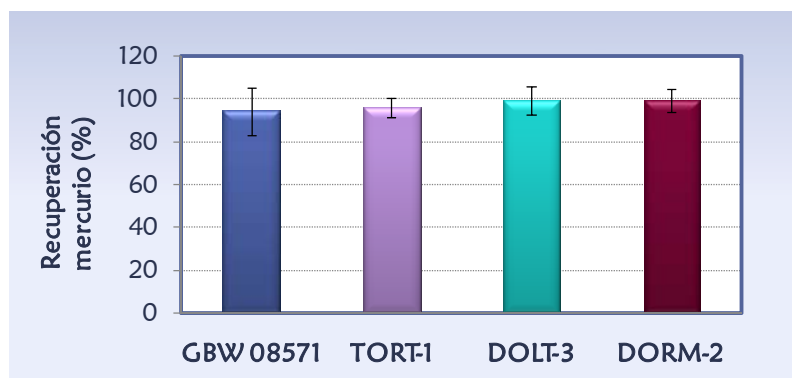


Figura 3.5. Evaluación de la extracción de mercurio en materiales de referencia certificados de muestras biológicas de origen animal

Se comprobó también que los valores obtenidos no presentaban diferencias estadísticamente significativas con los valores certificados al nivel de significación escogido ($p=0,05$) como se muestra en la *tabla 3.6*. Los límites de detección y cuantificación en estas condiciones fueron de 4 y 15 ng g^{-1} , respectivamente, y el porcentaje de desviación estándar relativa fue de 3,9 % (438 ng g^{-1} , $n=8$). En cuanto a la recta de calibrado, su ecuación fue la siguiente: $y = 19,376(\pm 5,163) + 4,329(\pm 0,100) \times (r^2=0,998)$.

Tabla 3.6. Evaluación de la exactitud en la determinación de mercurio en muestras biológicas de origen animal por FI-CV-AFS

Material de referencia	[Hg] _{total} \pm SD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	
	Valor certificado	Valor encontrado
GBW 08571	0,067 \pm 0,008	0,064 \pm 0,007 ($n=6$)
TORT-1	0,458	0,444 \pm 0,020 ($n=6$)
DOLT-3	3,37 \pm 0,14	3,35 \pm 0,22 ($n=8$)
DORM-2	4,64 \pm 0,26	4,60 \pm 0,24 ($n=8$)

2.4 DETERMINACIÓN DE MERCURIO TOTAL EN PLANTAS DE ORIGEN ACUÁTICO

Debido a la escasez de materiales de referencia certificados disponibles para mercurio en plantas acuáticas, la optimización de este método fue realizada utilizando un único material de referencia certificado, el BCR 60. Este material corresponde a una planta de origen acuático (*Lagarosiphon major*) y fue suministrado por la *Commission of the European Communities*. Dicho material presenta un contenido en mercurio de 0,34 \pm 0,04 $\mu\text{g g}^{-1}$.

La extracción del mercurio de las muestras se llevó a cabo utilizando un sistema de extracción en recipientes cerrados con microondas (Milestone, Ethos Plus) y siguiendo un método de extracción descrito en la bibliografía (22). Como agente de extracción se emplearon 9 mL de ácido nítrico concentrado y el programa de tiempos y temperaturas aplicado fue el siguiente:

- Etapa 1: T_{ambiente} - 180 °C (5 minutos)
- Etapa 2: 180 °C (10 minutos)
- Etapa 3: 180 °C - T_{ambiente} (15 minutos)

La cantidad de muestra utilizada fue la misma seleccionada para muestras biológicas de origen animal, es decir, 0,2 gramos ya que dicha cantidad ofreció buenos resultados en la determinación anterior.

En cuanto a las condiciones de medida, se seleccionó de nuevo un medio ácido nítrico al 2 % ya que este ácido era el agente utilizado en la extracción. Sin embargo, la concentración del reductor se redujo respecto a la utilizada en la determinación de las muestras biológicas de origen animal. Esto fue debido a que se volvió a probar como reductor cloruro estannoso al 2 %, concentración utilizada en la determinación de aguas y sedimentos, obteniéndose resultados satisfactorios.

Al evaluar el programa de extracción propuesto para cinco alícuotas diferentes del material BCR 60 utilizando 0,2 gramos de muestra y 9 mL de HNO_3 (65 %) y midiendo cada extracto por triplicado en el sistema FI-CV-AFS empleando las condiciones ya descritas, se obtuvieron valores que no presentaban diferencias estadísticamente significativas con el valor certificado al nivel de significación seleccionado ($p=0,05$) (tabla 3.7).

En cuanto a las características analíticas del método, los límites de detección y cuantificación encontrados fueron de 17 y 58 ng g⁻¹, respectivamente, la ecuación de la recta utilizada fue: $y = 50,896(\pm 19,370) + 7,019(\pm 0,377) \times (r^2=0,991)$ y el porcentaje de desviación estándar relativa fue de 3,8 % (346 ng g⁻¹, $n=10$).

Tabla 3.7. Evaluación de la exactitud en la determinación de mercurio en plantas de origen acuático por FI-CV-AFS

Material de referencia	[Hg] _{total} ±SD (µg g ⁻¹)	
	Valor certificado	Valor encontrado
BCR 60	0,34±0,04	0,349±0,013 (n=5)

3.- DETERMINACIÓN INDIRECTA DE MERCURIO ORGÁNICO POR FI-CV-AFS

Los efectos tóxicos así como el comportamiento metabólico del mercurio dependen considerablemente de la forma química en la que éste se encuentre. Así, va a ser determinante poder diferenciar entre las formas orgánicas e inorgánicas del mercurio, especialmente en los tejidos de los peces que son la principal vía de exposición de los seres humanos a los compuestos orgánicos de mercurio (23, 24).

Existen diversos métodos analíticos que posibilitan la determinación del mercurio orgánico e inorgánico e incluso se han desarrollado métodos específicos para el análisis de las especies organomercuriales. Estos métodos de especiación ofrecen una información muy completa pero requieren largos tiempos de análisis ya que implican diferentes etapas en la preparación de las muestras, así como complejos acoplamiento instrumentales que pueden afectar a la fiabilidad del método y dificultar su aplicación en los análisis de rutina. Además, normalmente los métodos desarrollados para el estudio de los procesos de biotransformación del mercurio son sensibles únicamente al monometilmercurio, al ser la especie de mayor relevancia medioambiental, por lo que sería también importante desarrollar métodos que permitan la determinación selectiva del mercurio inorgánico en presencia de especies organomercuriales (20).

Debido a todo lo anterior, se consideró que era interesante desarrollar un procedimiento simple, rápido y preciso que permitiera determinar específicamente el mercurio inorgánico presente en tejidos de peces utilizando FI-CV-AFS. Esto haría posible la determinación indirecta de los contenidos en mercurio orgánico de estas muestras por diferencia, pues la cantidad de mercurio total podría conocerse aplicando los métodos descritos en el apartado anterior. De manera que sólo serían derivadas hacia la determinación específica de compuestos orgánicos aquellas muestras que dieran resultado positivo en cuanto al contenido de estas especies. Para todo ello se ha de incidir primeramente en la puesta a punto de un proceso de extracción selectiva de mercurio inorgánico.

3.1 OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE MERCURIO INORGÁNICO

Una de las etapas críticas en la determinación de especies de mercurio de forma independiente es la preparación de las muestras y, más concretamente, la etapa correspondiente de extracción. Así, las condiciones de extracción seleccionadas deben lograr una extracción máxima de las especies sin que se altere la estabilidad de ninguna de ellas, ya que en todo momento se debe evitar su posible interconversión (25).

Por todo ello la optimización de las condiciones de extracción de las especies de mercurio, utilizando de nuevo un sistema de calentamiento en recipientes cerrados por microondas (Milestone, Ethos Plus), se realizó aplicando en este caso un diseño factorial de experimentos.

Para llevar a cabo cualquier tipo de diseño estadístico experimental es necesario identificar, en primer lugar, los factores que pueden resultar más determinantes de modo que con el diseño del experimento se logren minimizar los efectos de dichos factores que, en principio, son incontrolados.

Según lo recogido en la bibliografía (18, 26-28) uno de los métodos recomendados para realizar una extracción diferenciada de las especies de mercurio es el de digestión alcalina utilizando bases como el hidróxido de tetrametilamonio (TMAH). En todas las aplicaciones encontradas en la bibliografía, este reactivo había sido utilizado en extracciones con ultrasonidos (18) o microondas con recipientes abiertos (28, 29), no existiendo ninguna aplicación para recipientes cerrados y especiación. Será necesario, por tanto, evaluar la influencia de otros parámetros determinantes en el proceso de extracción como son el volumen de extractante y el programa de tiempos y temperaturas aplicado.

Los tiempos de cada una de las etapas de extracción fueron establecidos según lo descrito en varias aplicaciones del sistema de extracción utilizado. De manera que se decidió utilizar un programa que constara de las siguientes etapas:

- Etapa 1: $T_{\text{ambiente}} - T_{\text{máxima}}$ (10 minutos)
- Etapa 2: $T_{\text{máxima}}$ (10 minutos)
- Etapa 3: $T_{\text{máxima}} - T_{\text{ambiente}}$ (15 minutos)

Por lo tanto, los otros dos parámetros de interés, es decir, el volumen de agente extractante (TMAH) y la temperatura máxima alcanzada en la extracción, se optimizaron aplicando un diseño factorial de experimentos.

Una vez descritos los factores a estudio, se debe definir el tipo de diseño experimental que se va a aplicar así como el intervalo en el que se van a estudiar cada uno de los factores. Atendiendo a la bibliografía consultada (30-33) se decidió aplicar un diseño factorial de 3 niveles con un punto central. Por tanto, se establecieron tres niveles para cada una de las dos variables a estudio, de manera que los experimentos se realizaron combinando los siguientes valores:

- ✓ Volúmenes de TMAH: 2, 5 y 8 mL
- ✓ Temperaturas máximas de extracción: 120, 150 y 180 °C

Estos valores para cada una de las variables fueron codificados correspondiendo el signo (+) al nivel superior, el signo (–) al inferior y el 0 al nivel central. Al definirse tres niveles para cada factor se optó por aplicar un diseño factorial general. Por tanto, el número total de posibles combinaciones sería de 3^2 , es decir, de 9 experimentos. Sin embargo, se llevaron a cabo un total de 11 experimentos correspondiendo tres de ellos al punto central (condiciones intermedias: 5,0 mL de TMAH y 150 °C). Las condiciones en las que se realizaron cada uno de los experimentos aparecen reflejadas en la *tabla 3.8*.

Tabla 3.8. Condiciones del diseño factorial de experimentos

Experimento	Temperatura extracción (° C)	Volumen TMAH (mL)	Temperatura extracción codificada	Volumen TMAH codificado
1	120	2	–	–
2	120	5	–	0
3	120	8	–	+
4	150	2	0	–
5	150	5	0	0
6	150	5	0	0
7	150	5	0	0
8	150	8	0	+
9	180	2	+	–
10	180	5	+	0
11	180	8	+	+

En todas las extracciones realizadas el volumen final fue de 10 mL pues es el volumen mínimo de trabajo para poder controlar la presión y temperatura en el interior de los digestores. Este volumen final fue ajustado añadiendo en cada caso el correspondiente volumen de agua desionizada.

Tras la etapa de extracción, se pasó a determinar el contenido en mercurio inorgánico de cada uno de los extractos utilizando el sistema FI-CV-AFS en las condiciones óptimas de medida. Como reductor se utilizó cloruro estannoso al 2 % (m/v) ya que para estas medidas es necesario utilizar un agente reductor que sea específico para el mercurio inorgánico. Además, a pesar de emplear un medio alcalino para la extracción, el análisis de mercurio se realizó en un medio ácido por lo que fue necesario neutralizar las muestras y acidificarlas con ácido nítrico antes de la determinación.

Para la evaluación del diseño experimental se utilizaron dos materiales de referencia certificados de tejidos de peces, DOLT-3 y DORM-2, cuyos contenidos en mercurio inorgánico y orgánico se indican en la *tabla 3.9*. Estos materiales fueron seleccionados porque representan una problemática muy diferente. Así, en el caso del DOLT-3 los contenidos en ambas formas del mercurio se encuentran prácticamente al 50 %, mientras que en el DORM-2 la mayor parte del mercurio se encuentra en forma de monometilmercurio, de manera que el mercurio inorgánico aparece en niveles de trazas.

Tabla 3.9. *Contenidos en mercurio inorgánico y orgánico de los materiales de referencia DOLT-3 y DORM-2*

Material de referencia	Tipo de material	[Hg inorgánico] ($\mu\text{g g}^{-1}$)	[Hg orgánico] \pm SD ($\mu\text{g g}^{-1}$)
DOLT-3	Hígado de cazón	1,67 ⁽¹⁾	1,70 ⁽²⁾
DORM-2	Músculo de cazón	0,17 ⁽¹⁾	4,47 \pm 0,32

(1): Valor calculado a partir del contenido total en mercurio certificado

(2): valor propuesto

Por tanto, para optimizar las condiciones de extracción se realizaron 11 extracciones de cada uno de los materiales según las condiciones indicadas anteriormente y se calcularon los porcentajes de recuperación de mercurio inorgánico respecto al valor certificado (*tabla 3.10*).

Tabla 3.10. Porcentaje de recuperación de mercurio inorgánico en las extracciones de los materiales de referencia DOLT-3 y DORM-2 bajo las condiciones del diseño factorial propuesto

Experimento	Temperatura extracción	Volumen TMAH	% R DOLT-3	% R DORM-2
1	–	–	80,2	97,1
2	–	0	75,4	90,6
3	–	+	86,6	109,4
4	0	–	89,8	102,9
5	0	0	79,6	116,5
6	0	0	74,2	110,6
7	0	0	86,6	119,4
8	0	+	61,7	123,5
9	+	–	100,1	111,8
10	+	0	85,0	89,4
11	+	+	31,2	97,1

Para evaluar la reproducibilidad del estudio se recurrió al punto central del diseño factorial. Se realizaron tres experimentos correspondientes a las condiciones intermedias o nivel 0. El cálculo de los coeficientes de

variación de estos tres experimentos (experimentos 5, 6 y 7) indica que la reproducibilidad es aceptable ya que se obtuvieron bajas desviaciones estándar relativas para ambos materiales (7,8 % para el DOLT-3 y 3,9 % para el DORM-2).

Las condiciones óptimas de extracción fueron deducidas del estudio del DOLT-3 donde la tendencia es más clara que para el DORM-2 en el que varios experimentos ofrecieron buenas recuperaciones. Para ello se representó gráficamente la superficie tridimensional de respuesta correspondiente al estudio factorial realizado que fue obtenida con el programa Statistica (StatSoft 1999) (*figura 3.6*).

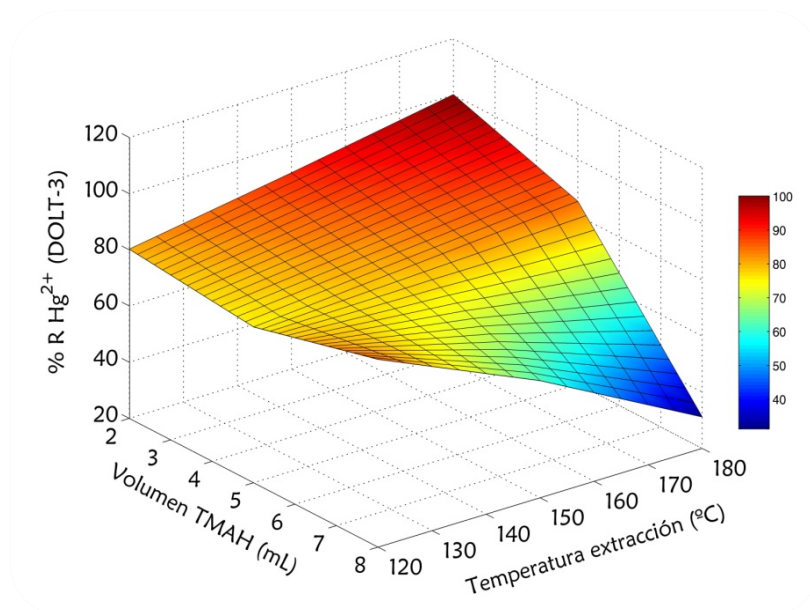


Figura 3.6. Superficie tridimensional de respuesta correspondiente a la optimización de la temperatura de extracción y el volumen de TMAH frente a la recuperación de mercurio inorgánico para el material de referencia DOLT-3

Como se deduce de la *figura 3.6*, los mejores resultados se obtuvieron para condiciones extremas, es decir, el volumen de extractante menor (2,0 mL) y la temperatura de extracción más alta (180 °C).

Por tanto, el método seleccionado consiste en la extracción por microondas en recipientes cerrados de 0,2 gramos de muestra utilizando 2,0 mL de TMAH al 25 % (m/m en metanol) y aplicando el siguiente programa de tiempos y temperaturas:

- Etapa 1: $T_{\text{ambiente}} - 180\text{ }^{\circ}\text{C}$ (10 minutos)
- Etapa 2: $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ (10 minutos)
- Etapa 3: $180\text{ }^{\circ}\text{C} - T_{\text{ambiente}}$ (15 minutos)

3.2 VALIDACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN SELECCIONADAS

El método optimizado fue validado aplicándolo a diferentes alícuotas ($n=8$) de los materiales de referencia certificados DOLT-3 y DORM-2, con los se había realizado también el diseño factorial de experimentos, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos y los certificados ni para mercurio inorgánico ni para mercurio orgánico como se muestra en la *tabla 3.11*.

Tabla 3.11. Evaluación de la exactitud del método de determinación indirecta de mercurio orgánico en materiales de referencia de muestras biológicas ($n=8$)

Material de referencia	Concentración de mercurio inorgánico ($\mu\text{g g}^{-1}$)		Concentración de mercurio orgánico ($\mu\text{g g}^{-1}$)	
	Valor certificado	Valor encontrado	Valor certificado	Valor encontrado (por diferencia)*
DOLT-3	1,67	$1,68 \pm 0,10$	1,70	$1,67 \pm 0,10$
DORM-2	0,17	$0,188 \pm 0,005$	$4,47 \pm 0,32$	$4,41 \pm 0,01$

(*: Este resultado fue calculado utilizando como contenido total en mercurio el hallado para este material al realizar la correspondiente evaluación del método de determinación de mercurio total en muestras biológicas de origen animal)

Los límites de detección y cuantificación para el mercurio inorgánico fueron de 26 y 87 ng g⁻¹, respectivamente. Además se obtuvo una buena repetitividad en la medida de una misma digestión ya que el porcentaje de desviación estándar relativa fue de 4,3 % (1,32 µg g⁻¹ de Hg²⁺, *n*=8).

Por último, se realizó un estudio de la estabilidad con el tiempo de las especies extraídas para evaluar la posibilidad de interconversiones posteriores a la extracción. Para ello una misma digestión del material de referencia DOLT-3 extraído según las condiciones optimizadas y que ya había sido medida al ser preparada, fue conservada a 4 °C y fue medida de nuevo cada diez días durante el mes siguiente a su preparación. Los resultados obtenidos en las cuatro determinaciones presentaron una desviación estándar relativa inferior al 9 %, lo que indica que no se produjeron degradaciones del monometilmercurio en el medio de extracción con el tiempo.

3.3 APLICACIÓN A MUESTRAS REALES DEL MÉTODO DE ESPECIACIÓN INDIRECTA DE MERCURIO

Una vez validado el método propuesto para la determinación indirecta de mercurio orgánico en tejidos de peces por FI-CV-AFS, dicho método fue aplicado al estudio de muestras reales. Las muestras analizadas correspondían a peces gato (*Ameiurus melas*) que fueron pescados en el Embalse de Guajaráz (Río Tajo, Toledo, España) utilizando la técnica de pesca eléctrica. Estas muestras procedían de una zona no expuesta a la contaminación por mercurio y por este motivo únicamente se utilizaron con el fin de evaluar las recuperaciones de las especies de mercurio realizando las correspondientes adiciones. De esta manera se podría evaluar las posibles interferencias de la matriz en las determinaciones y la aplicabilidad del método desarrollado al estudio de muestras reales.

El tejido que se empleó para el estudio fue el músculo. Así pues, los músculos de los peces fueron separados y conservados a una temperatura de -80 °C. Posteriormente fueron liofilizados y tras este proceso se conservaron

a -20 °C hasta su digestión. La muestra analizada procedía de la combinación de siete porciones diferentes que fueron convenientemente molidas y homogeneizadas tras su liofilización.

En primer lugar, esta muestra fue analizada aplicando el método de determinación de mercurio total en muestras biológicas de origen animal. A continuación, se determinó el contenido en mercurio inorgánico según el método de análisis descrito anteriormente. Los resultados obtenidos (*tabla 3.12*) indican que, como cabía esperar, prácticamente todo el mercurio presente en las muestras de pez gato se encuentra en forma de mercurio orgánico (monometilmercurio).

Tabla 3.12. *Contenidos en mercurio total e inorgánico de la muestra analizada*

Muestra	Hg ²⁺ (µg g ⁻¹)	Hg total (µg g ⁻¹)
Pez gato	< LOD	0,545±0,030 (n=8)

(LOD: límite de detección)

Para confirmar la fiabilidad de estos análisis, se realizaron adiciones de cantidades conocidas de mercurio inorgánico y monometilmercurio sobre las muestras. Este tipo de experimentos asumen que la extracción de la cantidad añadida es equivalente a la extracción del mercurio contenido en las muestras (25), por lo que de esta manera se puede evaluar el método de extracción diferencial de las especies de mercurio desarrollado.

Debido a que se disponía de una cantidad de muestra muy pequeña, únicamente se pudieron evaluar las recuperaciones de mercurio utilizando dos niveles de adición de mercurio inorgánico. No obstante, para que fuera posible estudiar simultáneamente la influencia de la presencia de monometilmercurio (CH₃Hg⁺), en uno de los niveles de adición se añadió también una cierta cantidad de monometilmercurio (*tabla 3.13*).

Tabla 3.13. Recuperaciones de mercurio inorgánico en presencia de metilmercurio en extractos de músculo de pez gato con adiciones de mercurio

Muestra	Hg ²⁺ añadido (µg g ⁻¹)	CH ₃ Hg ⁺ añadido (µg g ⁻¹)	Hg ²⁺ encontrado (µg g ⁻¹)
Adición I	0,30	---	0,335±0,030 (n=6)
Adición II	0,50	0,50	0,561±0,022 (n=6)

La forma de realizar este experimento consistió en adicionar el correspondiente volumen de la disolución patrón de mercurio inorgánico o monometilmercurio sobre la muestra sólida liofilizada de pez gato y dejar agitando durante 24 horas para lograr una buena homogeneización de la adición. Transcurrido ese tiempo se llevó a cabo la extracción en microondas utilizando las condiciones óptimas (2 mL de TMAH como agente extractante y una temperatura máxima de digestión de 180 °C). Posteriormente los extractos obtenidos fueron analizados utilizando el sistema FI-CV-AFS logrando en todos los casos recuperaciones de mercurio inorgánico próximas al 100 %, como se muestra en la *tabla 3.13*. Esto indica que el monometilmercurio no se degrada en las condiciones de análisis seleccionadas. Por tanto, una vez conocido el contenido en mercurio total, se podría calcular por diferencia el contenido de mercurio orgánico.

4.- CONCLUSIONES

En este capítulo se han desarrollado métodos analíticos sencillos, rápidos y reproducibles para la determinación de contenidos totales de mercurio en diferentes tipos de muestras medioambientales (aguas, sedimentos y muestras biológicas de origen animal y vegetal) basados en el análisis mediante un sistema de inyección en flujo, con generación de vapor

frío y determinación por espectroscopia de fluorescencia atómica (FI-CV-AFS). Los métodos correspondientes a la determinación de muestras sólidas comprenden una extracción ácida de las especies de la matriz sólida en un sistema de microondas utilizando recipientes cerrados de teflón y fueron validados utilizando materiales de referencia certificados.

Por otro lado, debido a que para evaluar la contaminación por mercurio no es suficiente con la determinación de contenidos totales, se ha desarrollado un procedimiento simple, rápido y preciso para la especiación indirecta de mercurio orgánico en muestras biológicas determinando específicamente el mercurio inorgánico presente en estas muestras por FI-CV-AFS. Esta metodología permite diferenciar entre las formas orgánicas e inorgánicas de mercurio sin necesidad de recurrir a los complejos acoplamiento instrumentales que suelen ser necesarios para realizar la especiación de este elemento lo que reduce el tiempo de análisis y permite su aplicación en los análisis de rutina.

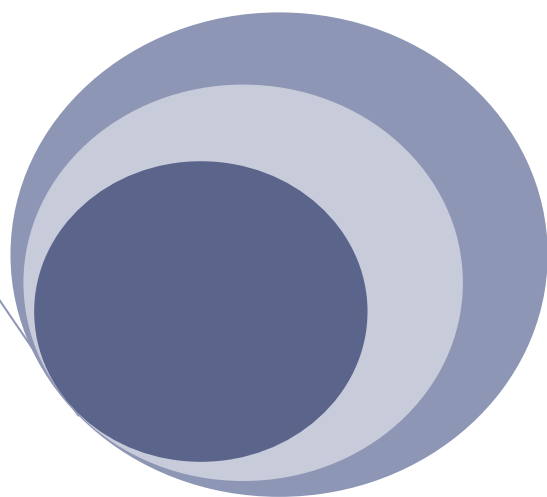
5.- BIBLIOGRAFÍA

1. Amini, N., Cardwell, T.J., Cattrall, R.W., Morrison, R.J.S., Kolev, S.D. On-line determination of mercury (II) by membrane separation flow injection analysis. *Talanta*. 2004, Vol. 63, p. 1069-1075.
2. Ramalhosa, E., Río Segade, S., Pereira, E., Vale, C., Duarte, A. Simple methodology for methylmercury and inorganic mercury determinations by high-performance liquid chromatography-cold vapour atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2001, Vol. 448, p. 135-143.
3. Coquery, M., Cossa, D. Mercury speciation in surface waters of the North Sea. *Netherlands Journal of Sea Research*. 1995, Vol. 34(4), p. 245-257.
4. Quémaraïs, B., Cossa, D., Rondeau, B., Pham, T.T., Gagnon, P., Fortin, B. Sources and fluxes of mercury in the St. Lawrence river. *Environmental Science and Technology*. 1999, Vol. 33, p. 840-849.
5. Gray, J.E., Theodorakos, P.M., Bailey, E.A., Turner, R.R. Distribution, speciation and transport of mercury in stream-sediment, stream-water and fish collected near abandoned mercury mines in southwestern Alaska, USA. *Science of the Total Environment*. 2000, Vol. 260, p. 21-33.
6. Balogh, S.J., Meyer, M.L., Johnson, D.K. Transport of mercury in three contrasting river basins. *Environmental Science and Technology*. 1998, Vol. 32, p. 456-462.
7. Milestone Ethos Plus Application Notes. *Application Note 060: Cellulose ester filter*. 2000.
8. Tseng, C.M., Amouroux, D., Brindle, I.D., Donard, O.F.X. Field cryofocussing hydride generation applied to the simultaneous multi-elemental determination of alkyl-metal(loid) species in natural waters using ICP-MS detection. *Journal of Environmental Monitoring*. 2000, Vol. 2, p. 603-612.
9. AENOR. *Calidad del agua. Determinación del mercurio por espectrometría de fluorescencia atómica*. Norma Española UNE-EN 13506, 2002.
10. Nguyen, H.L., Leermakers, M., Kurunczi, S., Bozo, L., Baeyens, W. Mercury distribution and speciation in Lake Balaton, Hungary. *Science of the Total Environment*. 2005, Vol. 340, p. 231-246.

11. Shi, J., Liang, L., Jiang, G., Jin, X. The speciation and bioavailability of mercury in sediments of Haihe River, China. *Environment International*. 2005, Vol. 31, p. 357-365.
12. Baeyens, W., Meuleman, C., Muhaya, B., Leermakers, M. Behaviour and speciation of mercury in the Scheldt estuary (water, sediments and benthic organisms). *Hydrobiologia*. 1998, Vol. 366, p. 63-79.
13. Hammerschmidt, C.R., Fitzgerald, W.F., Lamborg, C.H., Balcom, P.H., Visscher, P.T. Biogeochemistry of methylmercury in sediments of Long Island Sound. *Marine Chemistry*. 2004, Vol. 90, p. 31-52.
14. Hammerschmidt, C.R., Fitzgerald, W.F. Methylmercury cycling in sediments on the continental shelf of southern New England. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 2006, Vol. 70, p. 918-930.
15. Bartha, A., Ikrényi, K. Interfering effects on the determination of low concentrations of mercury in geological materials by cold-vapour atomic-absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 1982, Vol. 139, p. 329-332.
16. Milestone Ethos Plus Application Notes. *Application Note 031: Soil*. 2000.
17. Rodríguez Martín-Doimeadios, R.C. *Aportaciones al conocimiento del estado medioambiental de hidrosistemas de interés internacional situados en Castilla-La Mancha*. Tesis Doctoral: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Castilla-La Mancha, 1999.
18. Cabañero, A.I., Madrid, Y., Cámara, C. Evaluation of different sample pre-treatment and extraction procedures for mercury speciation in fish samples. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2002, Vol. 17, p. 1595-1601.
19. Cabañero, A.I., Carvalho, C., Madrid, Y., Batoréu, C., Cámara, C. Quantification and speciation of mercury and selenium in fish samples of high consumption in Spain and Portugal. *Biological Trace Element Research*. 2005, Vol. 103, p. 17-35.
20. Río-Segade, S., Bendicho, C. Selective reduction method for separate determination of inorganic and total mercury in mussel tissue by flow-injection cold vapor technique. *Ecotoxicology and environmental safety*. 1999, Vol. 42, p. 245-252.
21. Milestone Ethos Plus Application Notes. *Application Note 045: BCR 464 Tuna Fish*. 2000.

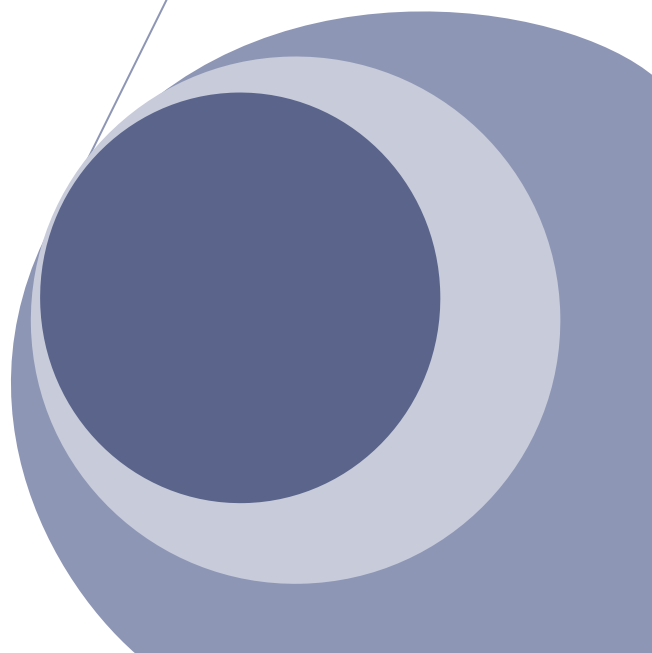
22. **Milestone Ethos Plus Application Notes.** *Application Note 002: BCR 60 Aquatic Plant.* 2000.
23. **Gochfeld, M.** Cases of mercury exposure, bioavailability and absorption. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 2003, Vol. 56, p. 174-179.
24. **Tchounwou, P.B., Ayensu, W.K., Ninashvili, N., Sutton, D.** Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health. *Environmental Toxicology.* 2003, Vol. 18, p. 149-175.
25. **Quevauviller, P., Morabito, R.** Evaluation of extraction recoveries for organometallic determinations in environmental matrices. *Trends in Analytical Chemistry.* 2000, Vol. 19(2+3), p. 86-96.
26. **Dietz, C., Madrid, Y., Cámara, C.** Mercury speciation using capillary cold trap coupled with microwave induced plasma atomic emission spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry.* 2001, Vol. 16, p. 1397-1402.
27. **Hiltelmann, H., Falter, R., Ilgen, G., Evans, R.D.** Determination of artifactual methylmercury (CH_3Hg^+) formation in environmental samples using stable Hg^{2+} isotopes with ICP-MS detection: Calculation of contents applying species specific isotope addition. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry.* 1997, Vol. 57, p. 363-370.
28. **Tseng, C.M., de Diego, A., Martin, F.M., Amouroux, D., Donard, O.F.X.** Rapid determination of inorganic mercury and methylmercury in reference biological samples by hydride generation, cryofocussing atomic absorption spectrometry after open-focused microwave field alkaline digestion. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry.* 1997, Vol. 12, p. 743-750.
29. **Tseng, C.M., de Diego, A., Pinaly, H., Amouroux, D., Donard, O.F.X.** Cryofocussing coupled to atomic absorption spectrometry for rapid and simple mercury speciation in environmental matrices. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry.* 1998, Vol. 13, p. 755-764.
30. **Montuori, P., Jover, E., Alzaga, R., Diez, S., Bayona, J.M.** Improvements in the methylmercury extraction from human hair by headspace solid-phase microextraction followed by gas-chromatography cold-vapour atomic fluorescence spectrometry. *Journal of Chromatography A.* 2004, Vol. 1025, p. 71-75.

31. De Diego, A., Tseng, C.M., Stoichew, T., Amouroux, D., Donard, O.F.X. Interferences during mercury speciation determination by volatilization, cryofocusing, gas chromatography and atomic absorption spectroscopy: comparative study between hydride generation and ethylation techniques. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 1998, Vol. 13, p. 623-629.
32. Vázquez, M.J., Carro, A.M., Lorenzo, R.A., Cela, R. Optimization of methylmercury microwave-assisted extraction from aquatic sediments. *Analytical Chemistry*. 1997, Vol. 69, p. 221-225.
33. Vázquez, M.J., Abuíñ, M., Carro, A.M., Lorenzo, R.A., Cela, R. Experimental design approach for the extraction of methylmercury from certified reference materials using microwave energy. *Chemosphere*. 1999, Vol. 39(7), p. 1211-1224.



Capítulo IV

Especiación de mercurio por GC-pyro-AFS



1.- DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE UN SISTEMA ACOPLADO DE CROMATOGRAFÍA DE GASES Y FLUORESCENCIA ATÓMICA

Se ha desarrollado un acoplamiento instrumental para el análisis de las especies de mercurio que está compuesto básicamente de tres elementos: un cromatógrafo de gases, una unidad pirolizadora y un detector de fluorescencia atómica, todos ellos descritos en el capítulo II (*figura 4.1*).

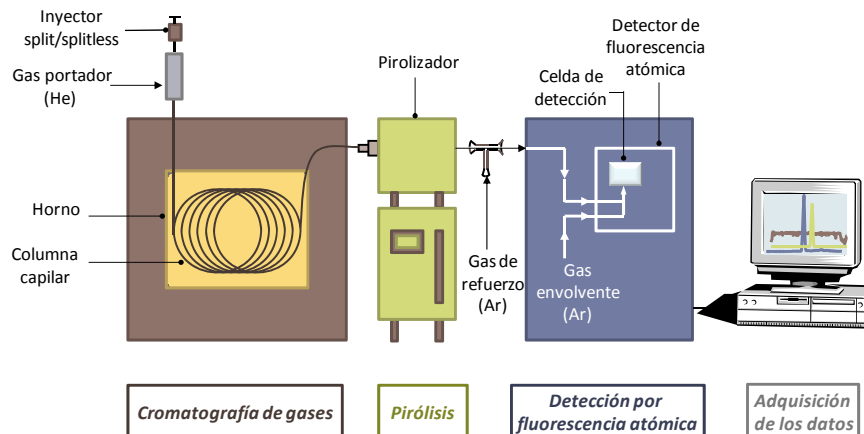


Figura 4.1. Acoplamiento instrumental para la especiación de mercurio

El funcionamiento de este sistema se basa en que las especies de mercurio introducidas en el cromatógrafo son arrastradas por una corriente de helio y se dirigen a la columna cromatográfica. La separación se lleva a cabo, por tanto, en una columna capilar que en su extremo final está conectada, por medio de una línea de transferencia (en nuestro caso, un tubo capilar sin relleno), a un pirolizador. En este sistema de pirólisis térmica las formas orgánicas del mercurio se descomponen bajo la acción de altas temperaturas (aproximadamente de unos 800 °C), de manera que la forma final en la que se encuentran las especies organomercuriales a la salida del pirolizador es mercurio elemental, el cual es volátil. La corriente de helio

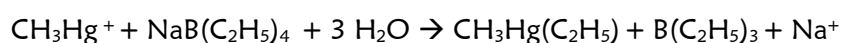
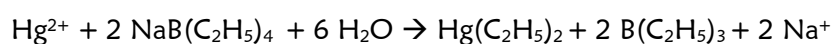
portadora del mercurio metálico es arrastrada con un flujo de argón (gas de refuerzo) que conduce el mercurio al detector de fluorescencia atómica. Así, la señal obtenida con este detector es registrada en el tiempo y las especies químicas son identificadas por su tiempo de retención.

1.1 ADECUACIÓN DE LAS FORMAS DE MERCURIO PARA SU ANÁLISIS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES

Para poder llevar a cabo un análisis de las formas de mercurio mediante cromatografía de gases, es necesaria una adecuación previa de dichas formas. Esto se debe a que las especies de mercurio más frecuentes en la Naturaleza son las formas iónicas de este elemento (Hg^{2+} y CH_3Hg^+). Sin embargo, estas especies no pueden analizarse directamente por cromatografía de gases al no ser volátiles. Por tanto, se requiere una etapa previa de derivatización en la que las formas iónicas pasen a otras volátiles de menor polaridad susceptibles de ser analizadas mediante esta técnica cromatográfica (1-4).

Esta etapa de adecuación de las formas iónicas de mercurio puede llevarse a cabo siguiendo diferentes procedimientos de extracción o derivatización. De entre todos ellos el método seleccionado fue el de derivatización con un agente etilante como es el tetraetilborato de sodio ($\text{NaB}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$). Esta elección se debió, entre otros motivos, a que este reactivo permite la derivatización en medio acuoso y a su disponibilidad comercial, frente a otros agentes que han de ser sintetizados en el laboratorio.

Como ya se indicó en la introducción, las reacciones que tienen lugar en este proceso de etilación serían las siguientes:



Así pues, las especies que verdaderamente analizaremos serán el mercurio inorgánico en forma de $\text{Hg}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ y el monometilmercurio en forma de $\text{CH}_3\text{Hg}(\text{C}_2\text{H}_5)$. (Para simplificar de ahora en adelante nos referiremos a estas especies como Et_2Hg y EtMeHg , respectivamente).

El protocolo de derivatización utilizado inicialmente se basó en el descrito en uno de los trabajos revisados aunque en ese caso se utilizaba como técnica de detección el ICP-MS (5). Según dicho protocolo, el pH adecuado del medio para llevar a cabo la derivatización es de 3,9. Así, la etilación se realizó con tetraetilborato de sodio a $\text{pH}=3,9$ en un medio acético-acetato y extrayendo las especies en una fase orgánica.

Para seleccionar el disolvente orgánico más adecuado para la extracción de las especies se probaron dos fases orgánicas, isooctano y hexano, que son los disolventes orgánicos que suelen ser utilizados para este tipo de determinaciones (2, 5, 6). Finalmente se eligió el hexano como medio de extracción, puesto que se observó que se conseguía una señal mayor, del 15 al 20 % superior, en hexano que en isooctano.

Una vez seleccionado el disolvente orgánico, se procedió a evaluar la estabilidad de los extractos etilados antes de proceder a su medida. Por ello, se estudió la estabilidad de las especies durante una semana comparando los resultados de cada una de las medidas con los obtenidos al analizar la muestra recién derivatizada (tiempo cero) por medio del parámetro R definido según la siguiente expresión:

$$R = \frac{X}{X(t=0)}$$

donde X es el valor medio de las medidas realizadas a los diferentes tiempos.

La incertidumbre de estas medidas de estabilidad también fue evaluada a través de la incertidumbre combinada (U_c) que viene dada por la expresión:

$$U_t = (CV^2 + CV^2_{(t=0)})^{1/2} \frac{R}{100}$$

donde CV es el coeficiente de variación de X.

La representación de R frente al tiempo de almacenamiento de las muestras derivatizadas (*figura 4.2*) indicó que las especies de mercurio etiladas (Et_2Hg y EtMeHg) permanecen estables durante 4 días. A partir de ese momento se observa una disminución considerable de la señal que llega a ser incluso superior al 50 % transcurrida una semana. Además, en la *figura 4.2* aparecen representadas las incertidumbres combinadas (U_i) correspondientes a cada valor de R que oscilaron entre 0,002 y 0,092.

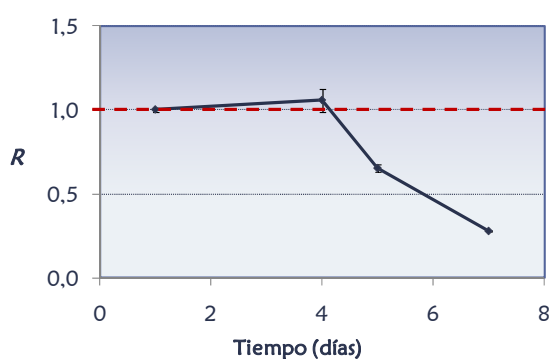


Figura 4.2. Estabilidad de las especies de mercurio etiladas en hexano

Atendiendo a todo lo anterior, el protocolo de derivatización seleccionado, que aparece esquematizado en la *figura 4.3*, consta de las siguientes etapas:

En primer lugar, a 2 mL de la disolución problema dispuestos en un vial de cristal de 22 mL se le añaden 5 mL de una disolución tampón de ácido acético/acetato sódico 0,1 M para mantener el pH próximo a 3,9. A continuación se adicionan 2 mL de hexano y, por último, se añaden 5 mL de disolución de tetraetilborato de sodio al 0,1 % (m/v) que debe ser preparada

en atmósfera inerte de nitrógeno o argón. Esta mezcla se agita manualmente durante 10 minutos y luego se centrifuga a 600 g (3000 r.p.m.) durante 5 minutos. Finalmente, se procede a retirar 1 mL de la fracción orgánica que se transfiere a un vial de cristal de 2 mL y se conserva a 4 °C hasta su medida.

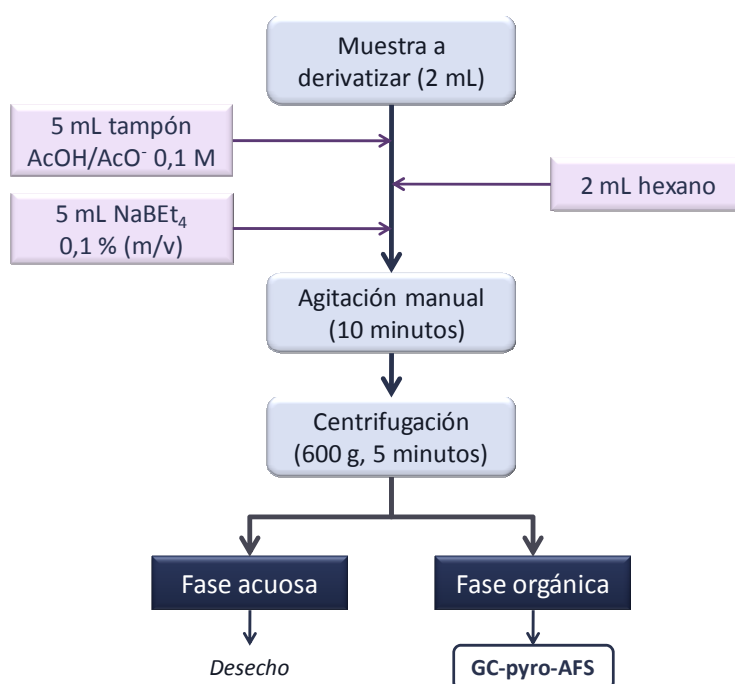


Figura 4.3. Esquema general del proceso de derivatización

1.2 OPTIMIZACIÓN DEL ACOPLAMIENTO INSTRUMENTAL

Para optimizar el sistema de especiación propuesto se estudiaron aquellos parámetros que podían afectar a la separación y a la detección de las especies analizadas. Estos parámetros podían ser tanto parámetros cromatográficos como parámetros propios de la pirólisis o la detección por fluorescencia. Por tanto, los parámetros evaluados fueron los siguientes:

- Parámetros cromatográficos
 - ✓ Características de la columna
 - ✓ Tipo y volumen de inyección
 - ✓ Temperatura de inyección
 - ✓ Programa de tiempos y temperaturas
 - ✓ Caudal del gas portador

- Parámetros del pirolizador
 - ✓ Temperatura de pirólisis

- Parámetros de la detección por fluorescencia atómica
 - ✓ Adquisición de la señal analítica
 - ✓ Ganancia
 - ✓ Caudal de gas de refuerzo
 - ✓ Caudal de gas envolvente

Dicha optimización se realizó utilizando una disolución con los patrones de mercurio inorgánico y monometilmercurio en concentraciones de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ derivatizada utilizando el procedimiento descrito anteriormente. Además a todas las disoluciones inyectadas se les añadió difenilmercurio en una concentración de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (como Hg) adicionado después de la derivatización para poderlo utilizar posteriormente como patrón interno. Se evaluó la posibilidad de añadir el difenilmercurio antes de la etilación pero se observó que durante este proceso se producía una transalquilación.

1.2.1 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

La **columna cromatográfica** que se utilizó en las separaciones realizadas fue una columna capilar apolar de 15 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno (tipo “narrowbore”) y una fase estacionaria DB-5 (95 % dimetilpolisiloxano, 5 % fenilmetilsilicona) de 0,25 μm de espesor.

El **programa de temperaturas** aplicado debe permitir una adecuada separación de las especies utilizando tiempos de análisis lo más cortos posibles. Así se comprobó que para obtener una buena separación de las especies de mercurio era necesario emplear una temperatura inicial de 40 °C ya que comenzando a temperaturas superiores (como 50 °C ó 60 °C) los picos correspondientes a las dos especies a estudio se solapaban. Además se observó que los picos se resolvían mejor manteniendo dicha temperatura durante unos minutos, por lo que el programa de temperaturas empleado fue el siguiente:

- Temperatura inicial: 40 °C (2 minutos)
- Rampa de temperaturas: 40 °C min⁻¹
- Temperatura final: 200 °C (2 minutos)

En cuanto al **caudal del gas portador** (helio), éste se fijó en un valor muy bajo (de 3,0 mL min⁻¹) ya que la columna capilar utilizada del tipo “narrowbore” no soporta flujos muy elevados. Además se comprobó que al aumentar dicho caudal (caudales de 5 ó 7 mL min⁻¹) disminuía la resolución de los picos correspondientes a las especies etiladas.

Otro parámetro optimizado fue el **tipo de inyección**. Se comprobó que, como era de esperar, al emplear inyección sin división (*splitless*) aumentaba la señal de las medidas comparadas con las realizadas con división (la señal se triplicaba) incluso utilizando las menores relaciones de *split* posibles (1:1). Por tanto, se decidió trabajar inyectando sin división de flujo.

Por último, se optimizó la **temperatura de inyección** ya que este parámetro juega también un papel fundamental. Temperaturas de inyección demasiado bajas no permitirían la volatilización de los analitos en el inyector, de manera que éstos no pasarían a la columna cromatográfica. Por el contrario, temperaturas de inyección demasiado elevadas podrían originar la descomposición de las especies inyectadas. Además tampoco han de utilizarse temperaturas superiores al límite máximo permitido por la columna

cromatográfica utilizada, que en nuestro caso era de 325 °C. Por tanto, se estudió el efecto de la temperatura de inyección tanto para el área como para la anchura de pico en el intervalo 150-300 °C con incrementos de 50 °C. Se observó que el área de pico asciende ligeramente con la temperatura y a su vez que el ancho de los picos disminuye (figura 4.4), por ello la temperatura de inyección seleccionada fue de 300 °C. En estas condiciones la resolución obtenida entre los picos de las dos especies estudiadas fue de 18,21.

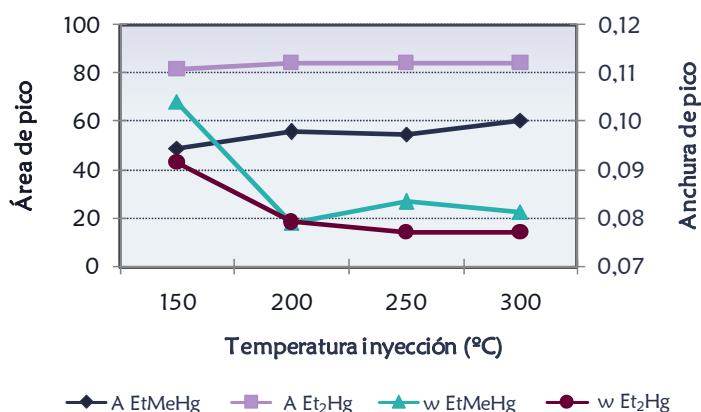


Figura 4.4. Influencia de la temperatura de inyección en el área (A) y la anchura (w) de los picos obtenidos en la separación cromatográfica

1.2.2 ADQUISICIÓN DE LA SEÑAL ANALÍTICA

La ganancia o sensibilidad en las medidas se fijó en 1000, ya que en el análisis de metales traza, como es el mercurio, se requiere siempre la máxima sensibilidad posible. Por tanto, establecido el intervalo de medida o ganancia en 1000 quedaría por evaluar el efecto del factor de filtro aplicado.

Este parámetro está relacionado con la adquisición de los datos pues indica la densidad de puntos que se utiliza a la hora de representar la correspondiente señal analítica. Esto puede ser determinante en estas medidas debido a que la señal no es continua, como sucedía en las

determinaciones por FI-CV-AFS, sino que es una señal transitoria correspondiente a una separación cromatográfica. En las medidas realizadas por FI-CV-AFS se conocía la correspondencia existente entre la ganancia seleccionada y el filtro óptimo. Sin embargo, en este caso se desconoce y puede que dicha relación sea diferente. Por este motivo se estudiaron los resultados obtenidos con los valores de 64, 32, 16 y 8 que son los propuestos para el sistema FI-CV-AFS.

Se evaluó de nuevo el efecto tanto en el área como en la anchura de los picos observándose (*figura 4.5*) que este parámetro apenas influye en el área pero sí presenta un importante efecto en la anchura de los picos. A pesar de que las anchuras de pico menores se obtuvieron para el valor del filtro menor estudiado igual a 8, se seleccionó un factor de filtro de 16 como valor óptimo. Esto se debió a que al disminuir el valor del factor de filtro se observó también un aumento en la relación señal/ruido del cromatograma lo cual podría interferir posteriormente en el cálculo de los límites de detección y cuantificación. Aplicando un factor de filtro de 16 para la adquisición de la señal analítica, la resolución encontrada entre los picos fue de 16,90.

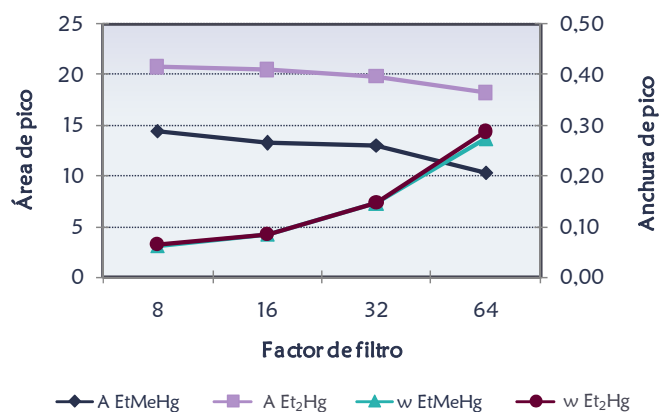


Figura 4.5. Influencia del factor de filtro en el área (A) y la anchura (w) de los picos obtenidos en la separación cromatográfica

1.2.3 TEMPERATURA DE PIRÓLISIS

Para que la detección de mercurio sea óptima es necesario que las especies de mercurio separadas en el cromatógrafo de gases se transformen en mercurio elemental, el cual será detectado en el espectrómetro de fluorescencia atómica. Con temperaturas de pirólisis demasiado bajas no se conseguiría una adecuada atomización de las especies químicas de mercurio. Sin embargo, a temperaturas muy elevadas se podría producir una reducción de la sensibilidad de algunas especies de mercurio como se ha comprobado en estudios previos (7). Así, teniendo en cuenta lo recogido en la bibliografía acerca de la temperatura más adecuada para la pirólisis, se estudió un estrecho intervalo de temperaturas comprendido entre 700-850 °C en incrementos de 50 °C.

En la *figura 4.6* se observan los resultados obtenidos de este estudio. Se seleccionó la temperatura de 800 °C como óptima, estableciendo una situación de compromiso entre una buena sensibilidad (área de pico grande) y una anchura de pico lo menor posible. En estas condiciones la resolución entre los picos fue de 18,32.

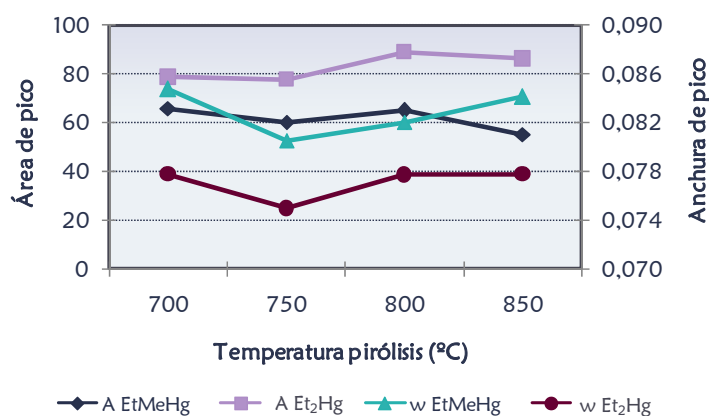


Figura 4.6. Influencia de la temperatura de pirólisis en el área (A) y la anchura (w) de los picos obtenidos en la separación cromatográfica

1.2.4 CAUDAL DE ARGÓN DE REFUERZO

La corriente gaseosa que sale del cromatógrafo no es por sí misma suficiente para generar picos altos y estrechos, fundamentalmente debido al bajo flujo de ésta y al diseño del detector (que requiere flujos de unos 300 mL min⁻¹ para su funcionamiento óptimo). Por tanto, para favorecer la formación de este tipo de picos es necesario el empleo de una corriente auxiliar que sirva como refuerzo.

Como gas de refuerzo debe utilizarse un gas diferente al helio que suele ser el gas portador en la separación cromatográfica. Esto se debe a que el helio es una molécula muy pequeña capaz de atravesar las paredes del tubo fotomultiplicador. Si esto ocurriera, el helio difundido a través del fototubo provocaría pérdidas de sensibilidad en el mismo, hasta dañarlo irreversiblemente. Para evitarlo se ha de introducir un gas no reactivo, con moléculas mayores, que permita diluir el helio presente debido al acoplamiento del detector de fluorescencia con el cromatógrafo de gases (7).

Normalmente como gas de refuerzo suele utilizarse una corriente de argón por las ventajas que presenta frente a otros gases en la detección por fluorescencia atómica. El flujo de esta corriente también debe ser optimizado ya que flujos de argón demasiado bajos generan picos anchos que podrían solapar entre sí, pero flujos demasiado elevados podrían hacer disminuir la señal.

Por ello se evaluó este caudal en un intervalo comprendido entre 60 y 220 mL min⁻¹ con incrementos de 30 mL min⁻¹. En vista de los resultados obtenidos que se muestran en la *figura 4.7* se seleccionó un caudal de argón de refuerzo de 150 mL min⁻¹ que será regulado a través del manómetro del pirolizador. Midiendo en esas condiciones la resolución entre los picos correspondientes a las dos especies estudiadas fue de 19,18.

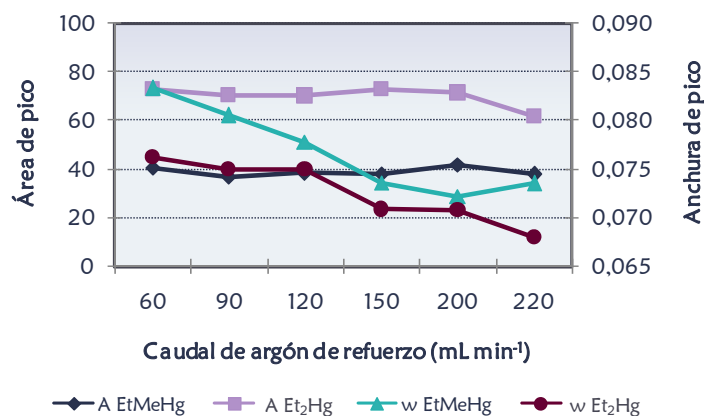


Figura 4.7. Influencia del caudal de argón de refuerzo en el área (A) y la anchura (w) de los picos obtenidos en la separación cromatográfica

1.2.5 CAUDAL DE ARGÓN ENVOLVENTE

La corriente de gas envolvente desempeña un papel fundamental ya que actúa como protector del tubo fotomultiplicador del detector. Esta protección es necesaria ya que como se indicó anteriormente se debe evitar que la corriente portadora de helio proveniente del cromatógrafo llegue hasta el detector. Además, esta corriente tiene una segunda función que es la de mantener confinada la corriente portadora de mercurio en un dominio espacial bien definido, ya que no existe ningún soporte físico que sostenga la muestra (7).

En nuestro caso, el valor del caudal de argón envolvente empleado fue de 300 mL min⁻¹ ya que es un parámetro prefijado en el equipo y que no es posible modificar. Por tanto, al igual que ocurría en el sistema FI-CV-AFS para obtener este flujo de argón habría simplemente que suministrar argón al detector a una presión aproximada de 40 psi. Haciendo esto el equipo se encargaría de regular automáticamente este aporte de gas de manera que la presión en el interior del mismo fuera de 30 psi que es la presión adecuada para que la corriente de argón auxiliar envolvente presente el valor óptimo.

1.2.6 CONDICIONES INSTRUMENTALES SELECCIONADAS

Las condiciones instrumentales óptimas se resumen en la *tabla 4.1*.

Tabla 4.1. *Parámetros óptimos para el acoplamiento GC-pyro-AFS*

Cromatógrafo de gases	
Columna	DB-5, 15 m x 0,25 mm x 0,25 μ m
Tipo de inyector	Split/Splitless
Volumen de inyección	1 μ L (en Splitless)
Temperatura de inyección	300 $^{\circ}$ C
Programa de temperaturas	40 $^{\circ}$ C (2 min.), 40 $^{\circ}$ C min $^{-1}$, 200 $^{\circ}$ C (2 min.)
Flujo de gas portador (helio)	3 mL min $^{-1}$
Analizador de mercurio	
Temperatura de pirólisis	800 $^{\circ}$ C
Características del detector	
Flujo de gas de refuerzo (argón)	150 mL min $^{-1}$
Flujo de gas envolvente (argón)	300 mL min $^{-1}$
Ganancia	1000
Factor de filtro	16

Asimismo, en la *figura 4.8* se muestra un cromatograma obtenido, en las condiciones anteriormente indicadas, para la mezcla de las formas derivatizadas del monometilmercurio (etilmetilmercurio) y del mercurio iónico divalente (dietilmercurio) junto con el patrón de inyección (difetilmercurio). La concentración de cada una de las especies fue de 50 μ g L $^{-1}$.

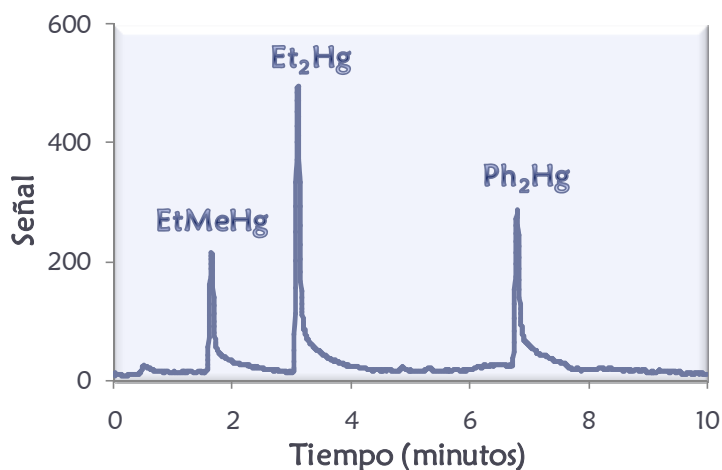


Figura 4.8. Cromatograma de una mezcla de estándares de concentración $50 \mu\text{g L}^{-1}$ en CH_3Hg^+ , Hg^{2+} y $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{Hg}$ (como Hg)

1.3 CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL ACOPLAMIENTO GC-pyro-AFS

Una vez optimizados los distintos parámetros que influyen en el sistema propuesto fue necesario proceder a caracterizarlo analíticamente. Para ello se calcularon en primer lugar los límites de detección y cuantificación. Posteriormente, se comprobó la proporcionalidad entre la señal analítica y la concentración para poder evaluar así la existencia de una respuesta lineal obteniendo las correspondientes rectas de calibrado. Así, los resultados obtenidos permitirán después decidir la forma en la que se va a realizar la determinación cuantitativa a partir del cromatograma obtenido.

1.3.1 LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

En los análisis de especiación de mercurio en los que se realiza una separación cromatográfica el cálculo de los límites de detección y

cuantificación se hará en función del nivel de ruido de la línea base. La forma de proceder para el cálculo de estos límites fue la siguiente:

En primer lugar, se realizó una inyección de un blanco obteniendo su correspondiente cromatograma en el que se midió la fluctuación del ruido expresada según la misma escala utilizada para las alturas de los picos. Esta medida se hizo en una zona concreta del cromatograma que comprendía unos dos minutos y en la que el ruido no fluctuaba demasiado. A continuación, se llevó a cabo la inyección de un patrón con concentraciones conocidas de los compuestos a estudio ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) y se midió la altura de cada uno de los dos picos obtenidos. Conocidos estos valores y la concentración a la que correspondían, se compararon estos últimos valores de altura y concentración con el valor de altura correspondiente a la fluctuación del ruido medido en el cromatograma del blanco. Así, relacionando alturas y concentraciones pudo calcularse una concentración equivalente para el blanco (c_B) correspondiente a cada uno de los compuestos. De manera que esto permitió el cálculo de los límites de detección y cuantificación aplicando las expresiones siguientes:

$$LD = 3 \cdot c_B$$

$$LC = 10 \cdot c_B$$

De los resultados obtenidos (*tabla 4.2*) puede deducirse la gran sensibilidad del sistema propuesto ya que dichos límites son del orden de los picogramos.

Tabla 4.2. Límites de detección (LD) y cuantificación (LC) del sistema GC-pyro-AFS

Especie	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LC ($\mu\text{g L}^{-1}$)
CH_3Hg^+	1,8	5,9
Hg^{2+}	1,0	3,4

1.3.2 RECTAS DE CALIBRADO

Atendiendo a los límites de detección y cuantificación obtenidos se decidió empezar a estudiar la linealidad desde una concentración de $5 \mu\text{g L}^{-1}$. Se llegó hasta $200 \mu\text{g L}^{-1}$ porque concentraciones superiores podrían generar problemas de contaminación en el sistema.

Para preparar los patrones de concentraciones conocidas en CH_3Hg^+ y Hg^{2+} se podría proceder de dos formas diferentes. Una de ellas sería la de derivatizar independientemente cada uno de los patrones de las diferentes concentraciones a estudio. La otra posibilidad sería derivatizar un patrón de concentración elevada a partir del cual se prepararían por dilución el resto de los patrones. Teniendo en cuenta que el proceso de derivatización es muy laborioso, de esta última forma se ahorraría tiempo en la preparación de las muestras y se economizaría el proceso. Para evaluar si existen diferencias entre ambos procedimientos se realizaron sendos calibrados y después se compararon estadísticamente las pendientes de las diferentes rectas de calibrado obtenidas procediendo de ambas formas.

Las rectas de calibrado obtenidas que aparecen en la *tabla 4.3* se calcularon ajustando por mínimos cuadrados los valores de área de pico (A) frente a la concentración (c) por lo que todas ellas son de la forma: $A = a + b c$, siendo a la ordenada en el origen y b la pendiente.

Tabla 4.3. Rectas de calibrado para la determinación de CH_3Hg^+ y Hg^{2+} con el sistema GC-pyro-AFS

Especie	Preparación patrón	Ecuación recta	r^2
CH_3Hg^+	Etilación directa	$A = -2,526(\pm 2,501) + 0,721(\pm 0,026)c$	0,9946
	Dilución	$A = -2,043(\pm 0,585) + 0,705(\pm 0,006)c$	0,9997
Hg^{2+}	Etilación directa	$A = 4,838(\pm 3,359) + 1,148(\pm 0,036)c$	0,9962
	Dilución	$A = -0,138(\pm 0,933) + 1,108(\pm 0,010)c$	0,9997

Se seleccionó como señal analítica el área de pico y no la altura, ya que este tipo de señal ofrece una mayor precisión en las determinaciones por cromatografía.

Una vez calculadas las rectas de calibrado con patrones preparados según ambos procedimientos se procedió a la comparación de dichas rectas. Para ambas especies, al comparar las varianzas de las rectas correspondientes a patrones obtenidos por etilación directa o dilución aplicando el *test de la F*, se obtuvo que $F_{\text{experimental}} > F_{\text{teórico}}$, lo que indicó que existían diferencias significativas entre las varianzas de las rectas. Por ello se realizó la comparación de las pendientes aplicando la aproximación de Cochran del *test de la t*. Así pues, se encontró que $t_{\text{calculado}} < t$ para las rectas de ambas especies, lo que demostró que en ambos casos no existían diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes de las rectas para el nivel de significación estudiado ($p=0,05$). Por tanto, esto indica que las rectas de calibrado obtenidas no se vieron afectadas por la forma de preparación de los patrones lo que permitirá poder prepararlos por dilución en ocasiones posteriores.

Además observando los coeficientes de determinación (r^2) se comprobó que existía una buena proporcionalidad entre áreas y concentraciones ya que en todos los casos los valores de estos coeficientes fueron muy próximos a 1, especialmente para las rectas calculadas con los patrones obtenidos por dilución.

Por último, para comprobar si las ordenadas en el origen de las rectas de calibrado obtenidas eran o no significativamente distintas de cero se aplicó el correspondiente test estadístico encontrándose en todos los casos que no existía error sistemático para el nivel de significación considerado ($p=0,05$). Con lo que estadísticamente las ordenadas en el origen de las rectas de calibrado podrían considerarse despreciables.

1.3.3 ASPECTOS CUANTITATIVOS

Existen diferentes métodos cuantitativos para el tratamiento de los datos proporcionados por el cromatograma. Entre ellos se encontrarían el método del estándar interno, el método de la calibración absoluta o relativa y, en el caso de que las ordenadas en el origen de las rectas de calibrado fueran despreciables, se podría aplicar también el método de intercalación de patrones y muestras. Algunos de estos métodos, como el método del estándar interno o el método de calibración relativa, se basan en utilizar una sustancia que generalmente no está presente en la muestra a cromatografiar y cuyo pico no coincida o solape con los de los compuestos de la muestra. Los cálculos se realizan relacionando las áreas y concentraciones de los compuestos con los de la sustancia estándar interna.

En nuestro caso, a pesar de inyectar en todas las medidas difenilmercurio como patrón interno, finalmente se descartó su uso para realizar la cuantificación por la falta de reproducibilidad en la medida de este compuesto. Así las correspondientes desviaciones estándar relativas de las áreas de cada una de las especies calculadas a partir de 10 inyecciones consecutivas fueron de 8,9 % para el $(C_6H_5)_2Hg$, 4,7 % para el $EtMeHg$ y 5,9 % para el Et_2Hg .

Otra posible alternativa para la cuantificación sería el uso del método de intercalación de patrones y muestras, ampliamente utilizado en laboratorios de control y en ciertas aplicaciones industriales, que presenta ventajas como la de proporcionar valores de incertidumbres significativos asumiendo que se realiza un número adecuado de medidas independientes (8). Este método se basa en el hecho de que, al ser la ordenada en el origen despreciable, las áreas y las concentraciones quedan relacionadas únicamente por el correspondiente factor de respuesta K . De manera que la cuantificación se realiza preparando dos patrones (P1 y P2) de las especies a determinar en una concentración exactamente conocida y que debe ser similar en ambos. Estos patrones serán inyectados de forma intercalada entre las inyecciones de las muestras. Así, la concentración de la muestra es

calculada por medio de la relación existente entre el área de pico de la muestra y el correspondiente factor de respuesta hallado en función de los factores de respuesta de cada uno de los patrones inyectados junto a la muestra:

$$\left. \begin{array}{l} A_{p1} = K_1 \cdot c_1 \\ A_{p2} = K_2 \cdot c_2 \end{array} \right\} K = \frac{K_1 + K_2}{2} \longrightarrow A_{\text{muestra}} = K \cdot c_{\text{muestra}}$$

2.- ESPECIACIÓN DE MERCURIO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS POR GC-pyro-AFS

Una vez desarrollado y caracterizado desde el punto de vista analítico el sistema GC-pyro-AFS, se procedió a poner a punto un método para la especiación de mercurio en muestras biológicas utilizando dicho sistema híbrido. Este procedimiento será complementario al método para la especiación indirecta de mercurio por FI-CV-AFS, presentado en el capítulo anterior, ya que permitirá determinar la concentración de monometilmercurio presente en aquellas muestras que ofrezcan un resultado positivo en cuanto al mercurio orgánico.

Para el desarrollo del método es necesario, en primer lugar, la optimización de la etapa de extracción desde la matriz, determinante en este tipo de tejidos (9). Asimismo se debe confirmar si las condiciones de derivatización optimizadas para estándares son también válidas para este tipo de muestras. La validación de ambas condiciones se llevó a cabo utilizando de nuevo los materiales de referencia DOLT-3 y DORM-2, aunque para comprobar la fiabilidad del método se realizaron también estudios de recuperación.

2.1 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN Y DERIVATIZACIÓN

Las condiciones de extracción seleccionadas deben permitir la extracción cuantitativa de las especies sin que se produzcan interconversiones de las mismas. Inicialmente se establecieron las mismas condiciones que las del método de especiación indirecta desarrollado en el capítulo anterior, pues ya se comprobó que eran adecuadas para la extracción diferencial de las especies de mercurio en tejidos biológicos. Por tanto, se volvió a realizar la digestión utilizando un sistema de extracción en recipientes cerrados (Milestone, Ethos Plus). Así, se probó la digestión de 0,2 gramos de muestra utilizando 2 mL de TMAH al 25 % (m/v en metanol) y aplicando el siguiente programa de tiempos y temperaturas:

- Etapa 1: T_{ambiente} - 180 °C (10 minutos)
- Etapa 2: 180 °C (10 minutos)
- Etapa 3: 180 °C - T_{ambiente} (15 minutos)

Una vez realizada la extracción, se llevó a cabo la derivatización siguiendo el protocolo propuesto anteriormente en el apartado 1.1. Al haber realizado una extracción alcalina de las muestras, fue necesaria la adición de ácido acético concentrado para alcanzar un valor de pH de 3,9. En cuanto al agente etilante se empleó una disolución de $\text{NaB}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$ al 0,1 % (m/v).

Tras la extracción y derivatización de las muestras, éstas se analizaron según las condiciones óptimas del sistema híbrido GC-pyro-AFS. En la *figura 4.9* se reflejan los resultados obtenidos al evaluar los porcentajes de recuperación, tanto para el monometilmercurio como para el mercurio inorgánico, en los dos materiales de referencia certificados estudiados. Se puede observar que las recuperaciones no fueron totalmente satisfactorias, ya que en el caso del DOLT-3 se recuperó bien el CH_3Hg^+ pero no así el Hg^{2+} (recuperación del 62 %), mientras que en el DORM-2 la recuperación del CH_3Hg^+ fue inferior al 90 % y la del Hg^{2+} presentó una gran desviación estándar relativa (15 %).

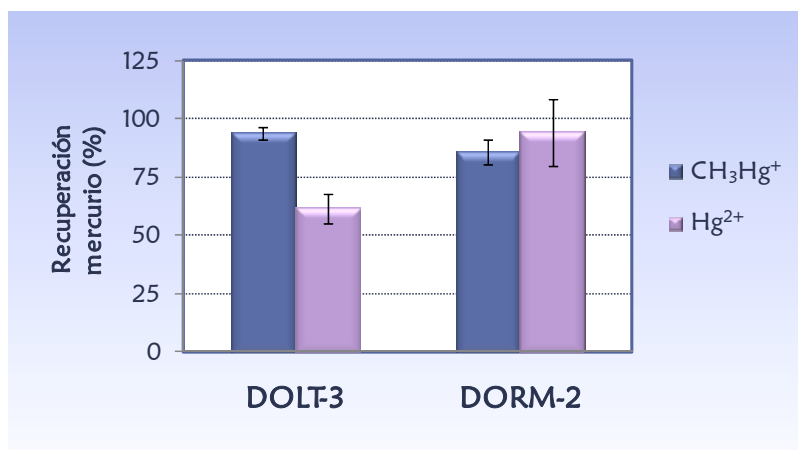


Figura 4.9. Evaluación de la etapa de extracción y derivatización de DOLT-3 y DORM-2 utilizando 2 mL de TMAH y $\text{NaB}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$ al 0,1 % (m/v)

Teniendo en cuenta que este procedimiento de extracción había dado resultados satisfactorios para la especiación indirecta, se estimó que los problemas observados podrían estar relacionados con el hecho de que para la determinación por GC-pyro-AFS fuera necesaria una destrucción más efectiva de la materia orgánica. Por tanto, se decidió evaluar el efecto que tenía un aumento en el volumen del agente extractante.

Manteniendo el resto de variables (condiciones de extracción y derivatización) se procedió a extraer con 5 mL de TMAH. Los resultados obtenidos (*figura 4.10*) son acordes a los encontrados en el capítulo anterior al aplicar el diseño factorial de experimentos. En ambos casos se obtuvieron bajas recuperaciones del DOLT-3 al utilizar volúmenes de extractante diferentes a 2 mL. Concretamente, las recuperaciones al realizar la extracción con 5 mL de TMAH fueron especialmente bajas para la especiación directa al encontrar recuperaciones del 55 % y 33 % para el CH_3Hg^+ y el Hg^{2+} , respectivamente. Sin embargo, para el DORM-2 varios volúmenes de TMAH ofrecieron buenas recuperaciones que, en muchos casos, eran superiores al 100 % para el mercurio inorgánico. Así pues, se estableció un volumen de 2 mL de TMAH como volumen óptimo de extracción.

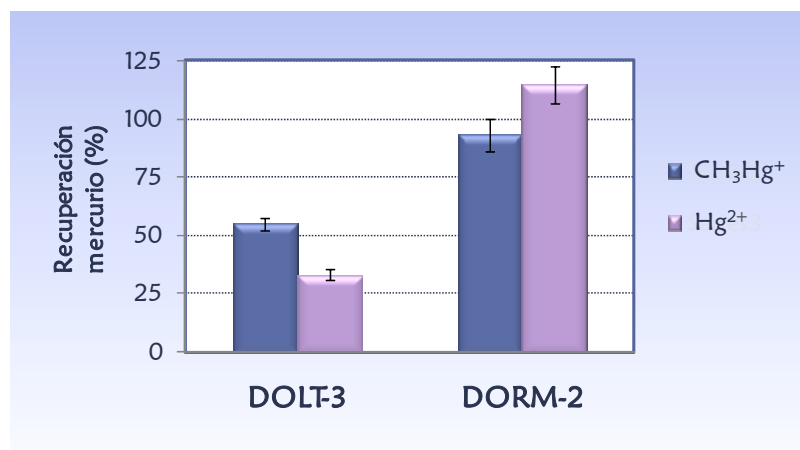


Figura 4.10. Evaluación de la etapa de extracción y derivatización de DOLT-3 y DORM-2 utilizando 5 mL de TMAH y $\text{NaB}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$ al 0,1 % (m/v)

Atendiendo a la bibliografía consultada, se observa que, en muchas ocasiones, para el tratamiento de muestras biológicas es necesario utilizar una concentración del agente etilante superior a la empleada para otro tipo de muestras (5, 10). Por este motivo se procedió a optimizar la concentración del tetraetilborato de sodio empleado en la derivatización.

Se evaluó el efecto de la concentración de tetraetilborato de sodio en la derivatización de extractos de los materiales de referencia biológicos utilizando concentraciones superiores al 0,1 % (m/v) pero manteniendo el resto de condiciones de extracción y medida. De los resultados obtenidos (*figura 4.11*) se deduce que al derivatizar este tipo de muestras parte del reactivo empleado es consumido por algún agente presente en el medio antes de reaccionar con las especies de mercurio. Así pues, debe utilizarse una concentración superior a la necesaria para la derivatización de estándares. Asimismo se observa que es suficiente aumentar la concentración a 0,3 % (m/v) pues en este caso ya se obtienen recuperaciones próximas al 100 % para ambas especies de mercurio en los dos materiales de referencia estudiados.

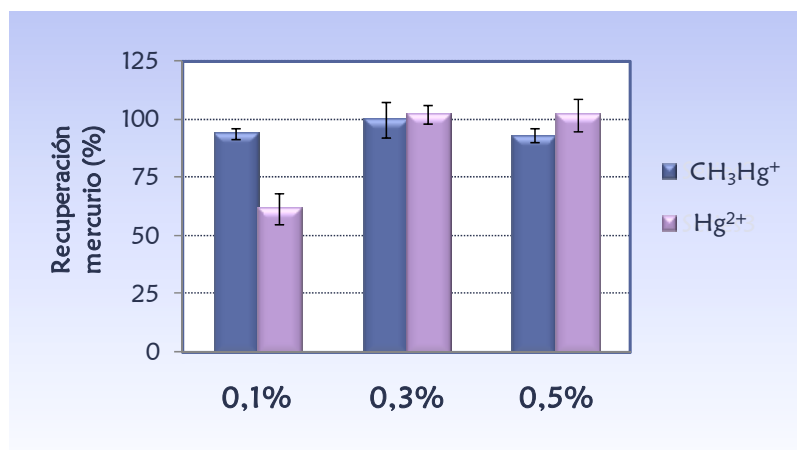


Figura 4.11. Efecto de la concentración del reactivo de etilación en la determinación de CH_3Hg^+ y Hg^{2+} en el material de referencia DOLT-3

2.2 APLICACIÓN A MUESTRAS BIOLÓGICAS

Tras la optimización de las condiciones de extracción y derivatización, el protocolo establecido para llevar a cabo la preparación de las muestras biológicas para su posterior análisis por GC-pyro-AFS se representa esquemáticamente en la *figura 4.12*.

Este procedimiento fue validado mediante el análisis de los materiales de referencia certificados, DOLT-3 y DORM-2, que corresponden a hígado y músculo de pez, respectivamente. Así, utilizando el protocolo de preparación de la muestra de la *figura 4.12* y utilizando el método de intercalación de patrones y muestras para la cuantificación, se obtuvieron resultados que no presentan diferencias estadísticamente significativas (para un nivel de significación de $p=0,05$) con los valores propuestos para los materiales de referencia certificados evaluados (*tabla 4.4*).

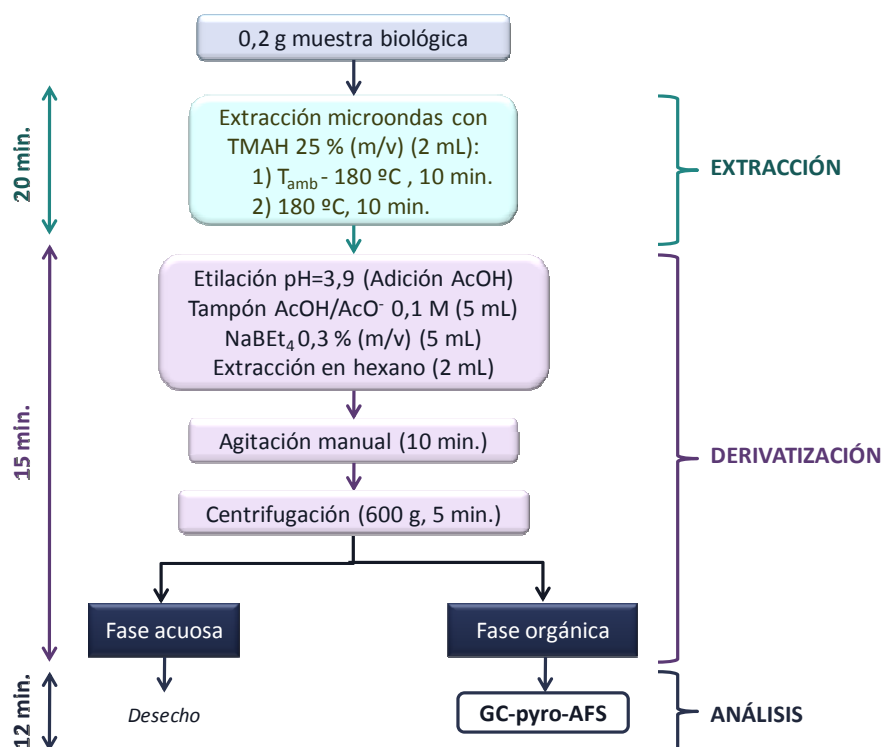


Figura 4.12. Esquema del procedimiento propuesto para la especiación de mercurio en tejidos de peces mediante GC-pyro-AFS

Tabla 4.4. Resultados en la determinación de mercurio en los materiales de referencia certificados DOLT-3 y DORM-2 mediante GC-pyro-AFS

Material de referencia	Monometilmercurio (como Hg) ($\mu\text{g g}^{-1}$)		Mercurio inorgánico ($\mu\text{g g}^{-1}$)	
	Valor certificado	Valor encontrado	Valor propuesto	Valor encontrado
DOLT-3	1,70	$1,71 \pm 0,12 (n=7)$	1,67	$1,71 \pm 0,06 (n=7)$
DORM-2	$4,47 \pm 0,32$	$4,54 \pm 0,32 (n=6)$	0,17	$0,17 \pm 0,04 (n=6)$

Asimismo procediendo de la forma indicada y midiendo en las condiciones óptimas del sistema GC-pyro-AFS, se obtuvieron los cromatogramas que se muestran en la *figura 4.13*.

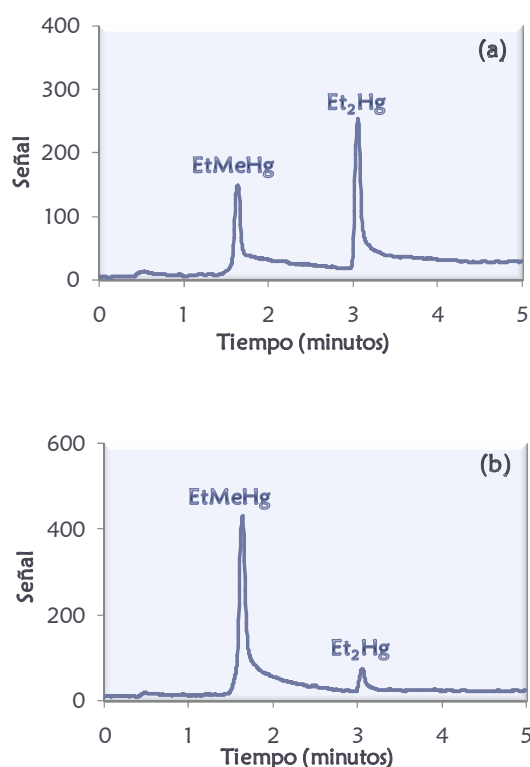


Figura 4.13. Cromatograma obtenido para el material de referencia certificado DOLT-3 (a) o DORM-2 (b) mediante GC-pyro-AFS

Por último, con el propósito de completar este estudio, se evaluaron las recuperaciones obtenidas añadiendo diferentes concentraciones de monometilmercurio y/o mercurio inorgánico sobre tejido biológico de músculo de pez. Las adiciones se realizaron de igual manera que en el apartado 3.3 del capítulo anterior, es decir, adicionando el correspondiente volumen de la disolución patrón de mercurio inorgánico o monometilmercurio sobre la muestra sólida liofilizada de músculo de pez y

dejando homogeneizar durante 24 horas. Como se observa en la *tabla 4.5* las recuperaciones fueron, en todos casos, próximas al 100 % para ambas especies lo que confirma la exactitud de los análisis. Además estos resultados sirven para corroborar que el procedimiento de extracción con microondas desarrollado permite extraer cuantitativamente las especies de mercurio de muestras reales sin alterarse la forma química de las mismas y obteniendo recuperaciones adecuadas.

Tabla 4.5. *Recuperaciones de las especies de mercurio adicionadas sobre tejidos de músculo de pez*

Concentración añadida ($\mu\text{g g}^{-1}$)		Concentración encontrada ($\mu\text{g g}^{-1}$)		Recuperación (%)	
CH_3Hg^+	Hg^{2+}	CH_3Hg^+	Hg^{2+}	CH_3Hg^+	Hg^{2+}
0	0	$0,63 \pm 0,06$	$0,16 \pm 0,02$	-	-
0	1,0	$0,68 \pm 0,07$	$1,11 \pm 0,13$	-	$93,3 \pm 10,2$
0	2,0	$0,69 \pm 0,06$	$2,05 \pm 0,11$	-	$94,0 \pm 5,4$
2,0	0	$2,64 \pm 0,09$	$0,26 \pm 0,05$	$99,9 \pm 4,3$	-
4,0	0	$4,82 \pm 0,16$	$0,22 \pm 0,03$	$104,4 \pm 5,8$	-
2,0	1,0	$2,60 \pm 0,19$	$1,12 \pm 0,06$	$97,6 \pm 8,4$	$95,9 \pm 6,1$
4,0	2,0	$4,44 \pm 0,29$	$2,21 \pm 0,09$	$95,1 \pm 7,1$	$102,3 \pm 4,7$

En comparación con otros procedimientos recogidos en la bibliografía (2, 3, 6, 9, 11) para la preparación de muestras para su análisis utilizando sistemas acoplados GC-pyro-AFS, el procedimiento para la especiación de mercurio en muestras biológicas desarrollado en este apartado

permite una importante reducción en el tiempo de análisis, incluyendo la etapa de extracción y de derivatización de las muestras, como se indica en la *figura 4.14*. Además puede observarse que el método propuesto es uno de los pocos, junto al de Cai et al. (6), que permite la determinación simultánea de las dos principales especies de mercurio presentes en la naturaleza, es decir, el monometilmercurio y el mercurio inorgánico, ya que el resto de los procedimientos reflejados en la *figura 4.14* sólo permiten determinar el monometilmercurio.

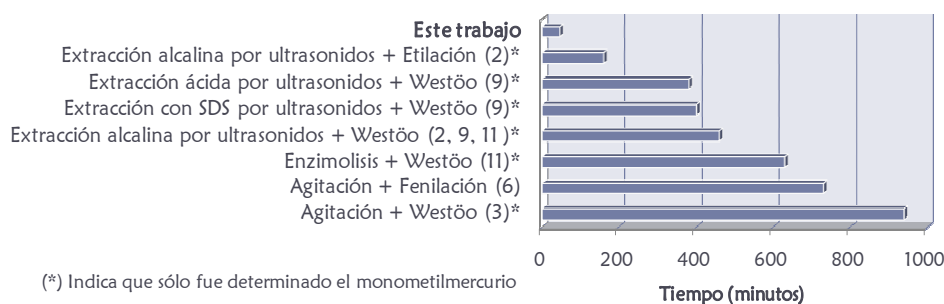


Figura 4.14. Comparación del tiempo necesario para la especiación de mercurio con cromatografía de gases acoplada a un detector de fluorescencia atómica con diferentes procedimientos para la preparación de la muestra (2, 3, 6, 9, 11)

3.- DETERMINACIÓN DE MONOMETILMERCURIO EN SEDIMENTOS MEDIANTE GC-pyro-AFS

A pesar de que todas las formas de mercurio son tóxicas, los principales efectos nocivos del mercurio tanto en el medio ambiente como sobre los seres humanos suelen estar relacionados con la transformación de las diferentes especies en monometilmercurio, que es la forma más tóxica y con mayor tendencia a bioacumularse (12). Los procesos de metilación y demetilación generalmente tienen lugar en los sedimentos. Por este motivo, es necesaria la determinación precisa y exacta de monometilmercurio en

sedimentos ya que de esta manera va a ser posible conocer mejor el ciclo biogeoquímico del mercurio así como estimar las exposiciones asociadas al mismo.

Los procedimientos analíticos utilizados para la determinación de monometilmercurio en sedimentos, al igual que sucede para otras especies organometálicas, suelen ser laboriosos y presentar diversos inconvenientes que complican la exactitud de los análisis debido a que constan de numerosas etapas. Por un lado, como ocurría en el caso de las muestras biológicas, se requiere la extracción de las especies de mercurio desde la matriz sólida, evitando que se produzcan interconversiones o pérdidas (13). Pero además, en el caso de los sedimentos, debido a los bajos niveles de monometilmercurio en presencia generalmente de altos contenidos de mercurio inorgánico, se hace necesario el desarrollo de etapas de preconcentración y limpieza, para llegar a límites de detección adecuados así como para evitar la generación artificial de monometilmercurio (14, 15).

Así pues, este apartado se va a centrar en el desarrollo de un procedimiento para la determinación de monometilmercurio en sedimentos mediante el sistema GC-pyro-AFS, siendo necesario para ello estudiar las correspondientes etapas de extracción, preconcentración y limpieza.

La optimización de la etapa de extracción se llevó a cabo utilizando dos sedimentos de referencia preparados en el laboratorio por adición de una determinada cantidad de monometilmercurio a sedimentos (T3 y T11) tomados en el río Tajo (Toledo, España) en abril de 2002. Estas muestras fueron tratadas tal y como se indicó en el capítulo II. Posteriormente, una porción de 50 gramos de cada sedimento fue mezclada con 10 mL de metanol que contenía una concentración conocida de monometilmercurio y se dejó agitando durante toda la noche para su estabilización. Una vez homogeneizada la adición, las muestras se conservaron a 4 °C hasta su análisis. Debido a que el contenido de CH_3Hg^+ en los sedimentos estaba por debajo del límite de detección, la concentración adicionada se correspondió con la concentración total de monometilmercurio en estas muestras. Así,

considerando que no se produjeron pérdidas durante el secado o el almacenamiento, la concentración de monometilmercurio adicionada fue de 50 ng g⁻¹. Además estos sedimentos fueron analizados para conocer también su contenido en mercurio total (*tabla 4.6*). Para ello se aplicó el método de determinación de mercurio total en sedimentos desarrollado en el capítulo anterior.

Tabla 4.6. Contenidos en monometilmercurio y mercurio total de los sedimentos de referencia preparados

Muestra	[CH ₃ Hg ⁺] añadido (ng g ⁻¹)	[Hg] _{total} natural (μg g ⁻¹)
Sedimento T3	50,0	0,422±0,012 (n=3)
Sedimento T11	50,0	0,212±0,012 (n=3)

Por otro lado, para la optimización y validación de las etapas de preconcentración y limpieza, se utilizaron dos materiales de referencia certificados, IAEA-405 y CC-ERM-580, cuyas principales características se indican en la *tabla 4.7*.

Tabla 4.7. Materiales de referencia certificados empleados en la optimización del método de determinación de monometilmercurio en sedimentos

Material de referencia	Tipo de material	[Hg] _{total} certificado±SD (μg g ⁻¹)	[CH ₃ Hg ⁺] certificado±SD (ng g ⁻¹)	Organismo certificador
IAEA-405	Sedimento de estuario	0,810±0,040	5,90±0,57	International Atomic Energy Agency (Austria)
ERM-CC-580	Sedimento de estuario	132,0±3,0	75,5±3,7	Institute for Reference Materials and Measurements (Bélgica)

Estos sedimentos presentan una diferente problemática, el IAEA-405 contiene monometilmercurio en un bajo nivel de concentración mientras que el ERM-CC-580 tiene como inconveniente su altísimo contenido en mercurio inorgánico que dificultará la determinación del monometilmercurio. Por tanto, una vez validado el método analítico para estos materiales de referencia, éste podrá ser aplicado para todo tipo de sedimentos, es decir, para los procedentes de zonas no contaminadas así como para los altamente contaminados.

3.1 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN

Hasta el momento existen pocas aplicaciones que hayan utilizado la extracción por microondas en recipientes cerrados para la especiación de mercurio en sedimentos (16, 17), a pesar de las ventajas que ofrece, ya indicadas en la introducción.

Los parámetros estudiados fueron el tipo y la concentración del agente extractante y el programa de tiempos y temperaturas ya que son las variables con una mayor influencia en la eficacia de la extracción. Atendiendo a la bibliografía se consideró que los agentes extractantes más adecuados eran el ácido nítrico (16, 18-21) y el ácido clorhídrico (17). Por tanto, ambos ácidos fueron evaluados en diferentes concentraciones (2, 4 y 6 mol L⁻¹) utilizando en todos los casos el mismo programa de tiempos y temperaturas recogido en uno de los trabajos consultados (16). Así, los experimentos se realizaron tomando 1,0 g de muestra al que se le añadió 10 mL del correspondiente ácido y se le aplicó el siguiente programa de extracción:

- Etapa 1: T_{ambiente} - 100 °C (2 minutos)
- Etapa 2: 100 °C (10 minutos)
- Etapa 3: 100 °C - T_{ambiente} (10 minutos)

Los resultados de un estudio previo realizado para comprobar la estabilidad de las especies bajo la radiación microondas utilizando estándares que contenían monometilmercurio y mercurio inorgánico demostraron que las concentraciones óptimas para cada uno de los dos ácidos fueron 6 mol L⁻¹ para el HNO₃ y 2 mol L⁻¹ para el HCl. En el caso del ácido nítrico, al emplear concentraciones inferiores a 6 M se obtenían recuperaciones muy superiores al 100 %. Por el contrario, en el caso del ácido clorhídrico, sólo se lograba recuperar ambas especies con la concentración de 2 M ya que con concentraciones superiores sólo se recuperaba el mercurio inorgánico, debido quizá a la posible complejación del monometilmercurio con los cloruros del ácido no permitiéndose su extracción.

Una vez preseleccionadas las concentraciones de estos dos agentes extractantes, se pasó a evaluar el efecto de la temperatura. Para ello se estudiaron temperaturas comprendidas entre 60 y 150 °C manteniendo los tiempos de irradiación anteriores. Los resultados obtenidos (*tabla 4.8*) indican que las máximas recuperaciones se obtienen cuando se irradia a 80 °C ambos sedimentos de referencia utilizando cualquiera de los dos ácidos estudiados. Este hecho puede comprobarse en la *figura 4.15* donde se presentan los resultados obtenidos para el sedimento T-3.

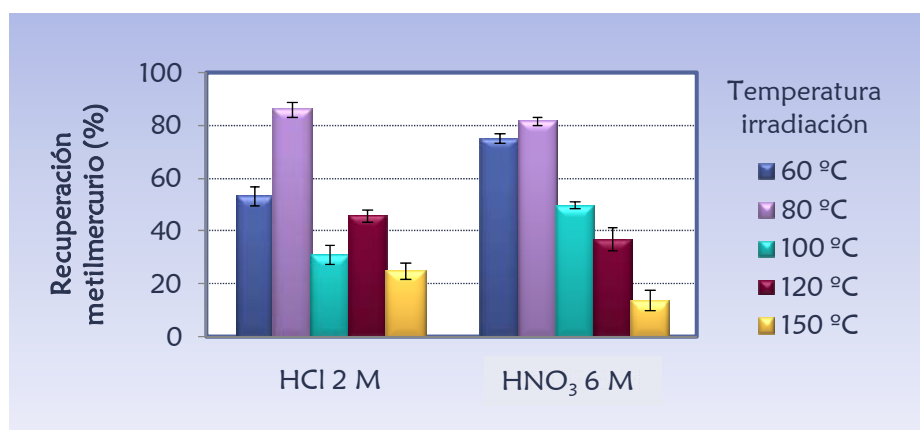


Figura 4.15. Evaluación de la influencia de la temperatura de irradiación en las recuperaciones de monometilmercurio obtenidas para el sedimento T3

Por tanto, fijando la temperatura de irradiación de 80 °C se procedió a evaluar la posible influencia que podían tener los tiempos de cada una de las etapas del programa de extracción.

En primer lugar, se estudió otro programa cuya suma de las dos etapas era de 12 minutos, al igual que en el programa utilizado hasta el momento (2+10 minutos) pero repartidos más equitativamente entre ambas fases (5+7 minutos). Las recuperaciones obtenidas aplicando esta nueva combinación fueron inferiores a las encontradas cuando se aplicaba la rampa inicialmente propuesta. A continuación, se pasó a estudiar dos combinaciones cuyo tiempo total fuera algo inferior para tratar además de reducir el tiempo de dicho proceso. Así, se probaron dos programas con un tiempo total de 10 minutos (3+7 y 5+5 minutos).

Los resultados obtenidos de ambos estudios (*tabla 4.8*) no permiten, en principio, establecer ninguna tendencia clara ya que en función del agente extractante y el sedimento de referencia estudiado se observa una influencia diferente. No obstante, en todos los casos, el programa de tiempos que ofreció mejores recuperaciones fue el de 5 minutos para cada una de las dos etapas utilizando ácido nítrico 6 M como reactivo de extracción por lo que finalmente fue el programa seleccionado.

Por tanto, de los resultados indicados en la *tabla 4.8* se deduce que es posible obtener recuperaciones próximas al 100 % cuando 1 gramo de sedimento se trata con 10 mL de HNO₃ 6 M con un calentamiento por microondas en recipientes cerrados aplicando el siguiente programa de tiempos y temperaturas:

- Etapa 1: T_{ambiente} - 80 °C (5 minutos)
- Etapa 2: 80 °C (5 minutos)
- Etapa 3: 80 °C - T_{ambiente} (10 minutos)

La desviación estándar relativa de este procedimiento de extracción fue menor del 1,5 % lo que indica la reproducibilidad del método.

Tabla 4.8. Porcentajes de recuperación de monometilmercurio en los sedimentos de referencia bajo diferentes temperaturas y tiempos de irradiación en la extracción con microondas

Sedimento adicionado	HCl 2 M				HNO ₃ 6 M			
	Temperatura (°C)	Recuperación (%)	Rampa	Recuperación (%)	Temperatura (°C)	Recuperación (%)	Rampa	Recuperación (%)
	(Rampa 2 min+10 min)				(Rampa 2 min+10 min)			
T3	60	53,6±3,7	2+10	86,2±2,7	60	75,3±1,9	2+10	81,7±1,4
	80	86,2±2,7	5+7	75,7±3,8	80	81,7±1,4	5+7	78,1±2,1
	100	31,3±3,7	3+7	87,4±8,5	100	50,0±1,2	3+7	77,2±8,8
	120	46,0±2,1	5+5	97,7±1,3	120	37,2±4,4	5+5	97,2±6,2
	150	25,2±3,0			150	14,1±3,7		
T11	60	54,1±3,2	2+10	59,45±0,34	60	52,6±3,3	2+10	87,5±2,9
	80	59,45±0,34	5+7	56,89±0,48	80	87,5±2,9	5+7	40,1±2,6
	100	42,2±6,0	3+7	79,2±3,9	100	63,0±2,6	3+7	36,5±5,8
	120	30,2±6,5	5+5	85,5±5,1	120	32,2±4,6	5+5	94,8±0,4
	150	28,0±1,4			150	29,5±3,2		

(Incertidumbres expresadas como la desviación estándar de tres medidas independientes)

3.2 ETAPA DE PRECONCENTRACIÓN

Los bajos niveles de concentración del monometilmercurio existentes en la mayoría de los sedimentos, inferiores generalmente al 1,5 % del mercurio total presente en los mismos (22, 23), hacen necesario el empleo de técnicas analíticas muy sensibles para su determinación. Por este motivo, en ocasiones va a ser necesario incorporar una etapa de preconcentración previa al análisis por GC-pyro-AFS para alcanzar límites de cuantificación que permitan determinar el monometilmercurio en muestras procedentes de zonas no expuestas a la contaminación por mercurio.

Para preconcentrar las muestras se utilizó una unidad evaporadora acoplada a un modulo calefactor de Pierce (Rockford, Illinois, USA) (*figura 4.17*) que permite la concentración simultánea de nueve muestras utilizando una corriente de nitrógeno. Dicha corriente se aplicó sobre los extractos de los sedimentos tras la etapa de derivatización, para concentrar las formas etiladas antes de la inyección en el sistema GC-pyro-AFS.



Figura 4.17. Unidad evaporadora para la preconcentración de las muestras

Los factores que podían influir en este proceso se estudiaron utilizando de nuevo los sedimentos de referencia preparados en el laboratorio. Debido a que este sistema permite combinar la corriente de nitrógeno con un calentamiento de hasta 150 °C, en primer lugar, se estudió la posibilidad de calentar para acelerar la evaporación. Se observó que si se

calentaba durante la aplicación de la corriente de nitrógeno las especies etiladas de mercurio se perdían, debido a su alta volatilidad.

A continuación trató de llevarse a cabo la preconcentración sin calentamiento pero llevando los extractos a sequedad para después reconstituir en un volumen conocido de un determinado disolvente. Sin embargo, a pesar de evaluar diferentes disolventes como hexano, diclorometano o isooctano, en ninguno de los casos se consiguió reconstituir las especies de mercurio. Esto parecía indicar que, o bien las especies se perdían por evaporación al mantener la exposición a la corriente de nitrógeno hasta llevar a sequedad, o bien que las formas etiladas se degradaban durante la evaporación.

Por todo ello, se decidió evaporar los extractos hasta un pequeño volumen pero sin llegar a la eliminación total del disolvente. El volumen final del extracto concentrado se calculó por pesada. Estos estudios demostraron que los extractos podían ser evaporados hasta un volumen límite de 20 μL .

Así pues, tomando inicialmente unos 500 μL del extracto con las especies de mercurio etiladas y evaporando con una corriente de nitrógeno sin calentar hasta un volumen de unos 25 μL , se lograron recuperaciones próximas al 100 % para los sedimentos de referencia T3 y T11 (*tabla 4.9*) pudiéndose alcanzar, en estas condiciones, factores de concentración de aproximadamente 20 veces.

Tabla 4.9. Porcentajes de recuperación de monometilmercurio en los sedimentos de referencia T3 y T11 tras la etapa de preconcentración

Sedimento	$[\text{CH}_3\text{Hg}^+]$ (ng g^{-1})	Recuperación CH_3Hg^+ (%)	Factor de concentración medio
T3	50,0	$91,3 \pm 2,0$	14,41
T11	50,0	$93,3 \pm 5,4$	17,24

3.3 ETAPA DE LIMPIEZA

Uno de los principales problemas que presenta la determinación de monometilmercurio en sedimentos muy contaminados es el hecho de que los altos contenidos de mercurio inorgánico presentes pueden interferir en su determinación. Por un lado, el mercurio inorgánico puede ocasionar problemas en la separación cromatográfica pero, además, y lo que es más importante, puede provocar una generación artificial de monometilmercurio que debe ser controlada.

Así pues, para desarrollar un método que permita el análisis de monometilmercurio en todo tipo de sedimentos, fue necesario estudiar ambos problemas así como poner a punto una etapa de limpieza en la que se logre eliminar o reducir el contenido de mercurio inorgánico en aquellos casos en los que su presencia pueda interferir.

3.3.1 EFECTO DEL MERCURIO INORGÁNICO: FRACCIÓN EXTRAÍBLE

En nuestras condiciones de trabajo, los problemas anteriormente mencionados van a venir dados no tanto por el contenido total en mercurio inorgánico como por la fracción de mercurio inorgánico co-extraído con el ácido nítrico 6 M durante el procedimiento de extracción y que, de ahora en adelante, denominaremos “mercurio inorgánico extraíble”.

La cantidad de mercurio inorgánico extraíble va a depender de las características de cada sedimento (24, 25). Utilizando las mismas condiciones de extracción, se evaluó la fracción extraíble en los sedimentos de referencia T3 y T11 así como en los materiales de referencia certificados IAEA-405 y ERM-CC-580. Los resultados obtenidos (*tabla 4.10*) muestran una gran variabilidad ya que el porcentaje de mercurio inorgánico extraíble oscila entre el 58 y el 85 % en el sedimento natural T11 y el material certificado ERM-CC-580, respectivamente. Además, estos valores indican una mayor disponibilidad del mercurio inorgánico en los materiales de referencia certificados que en los sedimentos naturales. Por otro lado, se determinó

también el contenido en carbono orgánico de cada uno de los sedimentos estudiados. Sin embargo, los valores obtenidos (*tabla 4.10*) no justifican el comportamiento observado en cuanto a la disponibilidad del mercurio inorgánico en los diferentes tipos de sedimentos.

Tabla 4.10. Caracterización de los sedimentos de referencia estudiados

Muestra	[Hg] _{total} (ng g ⁻¹)	[Hg ²⁺] extraíble (ng g ⁻¹)	(%)	C org. (%)
Sedimento T3	422	284	67,3	3,1
Sedimento T11	212	124	58,5	14,9
IAEA-405	804	681	84,7	1,8
ERM-CC-580	129000	107400	83,2	6,0

3.3.2 INTERFERENCIAS CROMATOGRÁFICAS

En el análisis de monometilmercurio en sedimentos muy contaminados por GC-pyro-AFS, el pico correspondiente a dicha forma organomercurial puede verse interferido por otras especies, como el mercurio elemental, cuyo tiempo de retención es muy próximo en la separación cromatográfica. Estas interferencias pueden provocar no sólo problemas relacionados con la resolución de los picos sino también la completa desaparición del pico del monometilmercurio al quedar éste bajo la señal interferente.

Para establecer una concentración límite de mercurio inorgánico a partir de la cual se producen problemas cromatográficos se llevó a cabo un estudio adicionando diferentes concentraciones de mercurio inorgánico a los sedimentos de referencia T3 y T11 a los que se le había añadido ya previamente una determinada concentración de monometilmercurio. Así, pese a que estas muestras ofrecieron cromatogramas en los que el pico del

monometilmercurio se definía bien, se comprobó que a partir de una concentración de 1000 ng g⁻¹ de mercurio inorgánico extraíble el pico correspondiente al mercurio inorgánico se descomponía en varios picos lo que comenzaba a provocar interferencias. Por tanto, desde el punto de vista cromatográfico, se consideró que sería necesario recurrir a la etapa de limpieza a partir de esta concentración.

3.3.3 GENERACIÓN ARTIFICIAL DE MONOMETILMERCURIO

Aparte de los problemas cromatográficos anteriormente comentados, la posible producción artificial de monometilmercurio durante el proceso analítico es el principal problema derivado de los altos contenidos de mercurio inorgánico presentes en los sedimentos (14, 15). Debido a los bajos niveles de concentración de monometilmercurio, que suelen representar entre el 0,1 y el 1,5 % del mercurio total, incluso una pequeña metilación artificial del orden del 0,02 ó 0,03 % del contenido en mercurio inorgánico, supondría una sobreestimación en la concentración de monometilmercurio encontrada del 30 al 80 % (13).

Hace unos años este asunto generó una gran controversia ya que incluso los contenidos de monometilmercurio certificados en algunos materiales de referencia llegaron a ser cuestionados (13, 26). Estas dudas fueron expresadas por primera vez durante la conferencia “Mercury as a Global Pollutant” celebrada en Hamburgo (Alemania) en 1996, volviéndose a manifestar dos años más tarde en un Workshop organizado por la Comisión Europea. Según estos supuestos, los contenidos de metilmercurio en los sedimentos de referencia certificados estarían sobreestimados y, por tanto, todos los estudios realizados por comparación con dichos materiales de referencia serían erróneos (20). No obstante, estudios posteriores demostraron que los materiales de referencia certificados que existen actualmente cumplen perfectamente los requisitos necesarios para verificar la exactitud de los métodos analíticos y permitir la comparabilidad de los datos obtenidos (13, 26). Sin embargo, existen motivos de preocupación suficientes

como para que deba ser tenido en cuenta en todos los análisis de especiación de mercurio en sedimentos, especialmente en los altamente contaminados.

Atendiendo a la bibliografía, se deduce que la generación artificial de monometilmercurio puede producirse durante las etapas de extracción (14, 27), derivatización (28) o separación (10) y va a depender principalmente de la cantidad de mercurio inorgánico (19, 29, 30). Por este motivo, para evaluar este efecto se adicionaron, antes de proceder a la extracción, diferentes concentraciones de mercurio inorgánico (de 1000 a 3000 ng g⁻¹) a uno de los sedimentos de referencia (T11) al que ya le había sido añadido previamente monometilmercurio (50 ng g⁻¹). Las recuperaciones obtenidas (*tabla 4.11*) fueron superiores al 100 % para las dos primeras adiciones lo que parecía indicar una posible formación artificial de monometilmercurio debida a la presencia del mercurio inorgánico, tal y como se había descrito ya en otros trabajos (10, 14, 19, 21, 28-30). Además, se observa que la adición en los niveles de concentración superiores no pudo ser medida correctamente debido a los problemas cromatográficos expuestos en el apartado anterior.

Tabla 4.11. Estudio de la generación artificial de monometilmercurio en el sedimento de referencia T11

Nivel	[Hg ²⁺] adicionado (ng g ⁻¹)	[Hg ²⁺] total (ng g ⁻¹)	[Hg ²⁺] extraíble (ng g ⁻¹)	[CH ₃ Hg ⁺]*	
				(ng g ⁻¹)	(%R)
0	0	212	124	46,6	93,2
1	1000	1212	1124	59,2	118,4
2	2000	2212	2124	54,2	108,4
3	3000	3212	3124	33,2	66,5

(*: 50 ng g⁻¹ de CH₃Hg⁺ añadidos previamente)

Para confirmar la generación artificial de monometilmercurio, se realizaron de nuevo adiciones de mercurio inorgánico pero esta vez sobre otra fracción del sedimento T11 a la que no se le había adicionado

monometilmercurio previamente. La adición se realizó en seis niveles de concentración antes de la extracción ácida con microondas. Los resultados obtenidos (*tabla 4.12*) indican que la cantidad de CH_3Hg^+ formada pese a ser muy pequeña, en torno al 0,6 % del mercurio inorgánico extraíble o 0,75 % del mercurio inorgánico total, representa una importante proporción en los sedimentos debido a su baja concentración de monometilmercurio. Este grado de metilación está dentro del intervalo encontrado en otros trabajos donde los porcentajes varían entre valores por debajo de 0,01 % y 5,0 % (19; 21; 30).

Tabla 4.12. Estudio de la generación artificial de monometilmercurio en el sedimento natural T11

Nivel	[Hg ²⁺] adicionado (ng g ⁻¹)	[Hg ²⁺] total (ng g ⁻¹)	[Hg ²⁺] extraíble (ng g ⁻¹)	[CH ₃ Hg ⁺] encontrado (ng g ⁻¹)	Grado de metilación vs [Hg ²⁺] total (%) vs [Hg ²⁺] extraíble (%)	
1	300	512	424	<LD	---	---
2	500	712	624	4,0	0,55	0,63
3	1000	1212	1124	7,4	0,61	0,74
4	1500	1712	1624	11,2	0,65	0,74
5	2000	2212	2124	13,9	0,63	0,70
6	2500	2712	2624	20,5	0,76	0,82

(LD: límite de detección)

Estos resultados indican además que la formación artificial de monometilmercurio se produce cuando la concentración de mercurio inorgánico añadida es superior a 500 ng g⁻¹, por lo que parece necesario intentar eliminar o reducir el contenido en mercurio inorgánico de los extractos antes de proceder a la derivatización, cuando se supera ese umbral de concentración.

3.3.4 OPTIMIZACIÓN DE LA ETAPA DE LIMPIEZA

Las condiciones óptimas para la etapa de limpieza serían aquellas en las que la recuperación del monometilmercurio fuera cuantitativa mientras que la cantidad de mercurio inorgánico transferida al extracto final fuera mínima. Existen diversas posibilidades para llevar a cabo la etapa de limpieza, aunque la mayoría se basa en una extracción diferencial de las especies de mercurio utilizando un disolvente orgánico (19, 31). Esta extracción puede combinarse, en ocasiones, con el empleo de agentes complejantes tales como acetato de cisteína (17) o ditizona (32). No obstante, la separación de las especies también podría lograrse mediante extracción en fase sólida utilizando adsorbentes sólidos como SCF (fibras de algodón de sulfhídrido) (6) o por intercambio iónico (30).

Según todo lo anterior, se optó por un protocolo de limpieza en el que se realizara una extracción selectiva del monometilmercurio utilizando diclorometano como disolvente. En principio, para facilitar la separación de las especies en ambas fases, se probó a añadir también agentes complejantes como acetato de cisteína o que facilitan la formación de pares iónicos como el perclorato sódico. Sin embargo, los experimentos realizados en estas condiciones no ofrecieron buenas recuperaciones de monometilmercurio ya que en la mayoría de los casos no se pudo llegar a recuperar dicha especie.

Por este motivo, se decidió estudiar la etapa de limpieza utilizando únicamente el disolvente orgánico seleccionado. A pesar de que la extracción previa con microondas se realizó en medio ácido nítrico 6 M, se comprobó que para poder realizar la extracción diferencial de las especies con diclorometano era necesario tener un medio de ácido clorhídrico. Así pues, se evaluaron tanto la cantidad de ácido clorhídrico como el número de etapas mínimas necesarias para que se produjera adecuadamente la limpieza del mercurio inorgánico del extracto. Finalmente, las condiciones óptimas fueron similares a las utilizadas en uno de los trabajos consultados (19), aunque en ese caso se empleaba el ICP-MS como sistema de detección. Dichas condiciones consisten en la adición de 1,5 mL de diclorometano y

100 μL de HCl concentrado a una alícuota de 3 mL de extracto del sedimento en HNO_3 6 M, la separación de las fases obtenidas tras agitar y la repetición de este proceso una segunda vez, como aparece esquemáticamente representado en la *figura 4.18*.

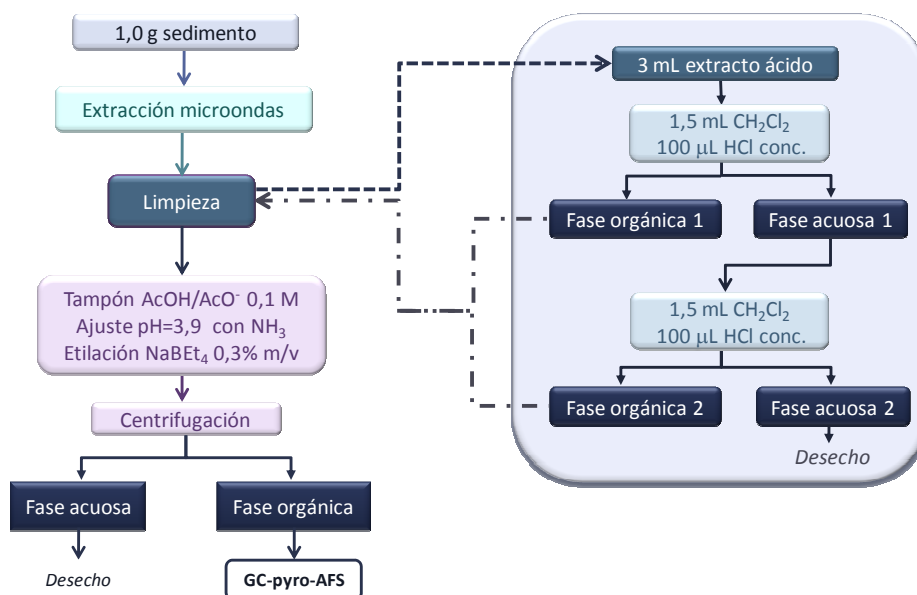


Figura 4.18. Esquema detallado de la etapa de limpieza incluida en el procedimiento para la determinación de monometilmercurio en sedimentos contaminados mediante GC-pyro-AFS

Las recuperaciones obtenidas aplicando este proceso a estándares con contenidos muy bajos de monometilmercurio y altas concentraciones de mercurio inorgánico estuvieron entorno al 100 % para el monometilmercurio y por debajo del 5 % para el mercurio inorgánico.

3.4 VALIDACIÓN DEL MÉTODO CON MATERIALES DE REFERENCIA CERTIFICADOS

La incorporación de las etapas de preconcentración y limpieza, anteriormente indicadas, en los casos en los que sea necesario, hace posible que el procedimiento desarrollado para la determinación de monometilmercurio sea aplicable a diferentes tipos de sedimentos. Por tanto, la estrategia general a seguir en el análisis de monometilmercurio en sedimentos mediante GC-pyro-AFS, según el método desarrollado, se esquematiza en la *figura 4.19*.

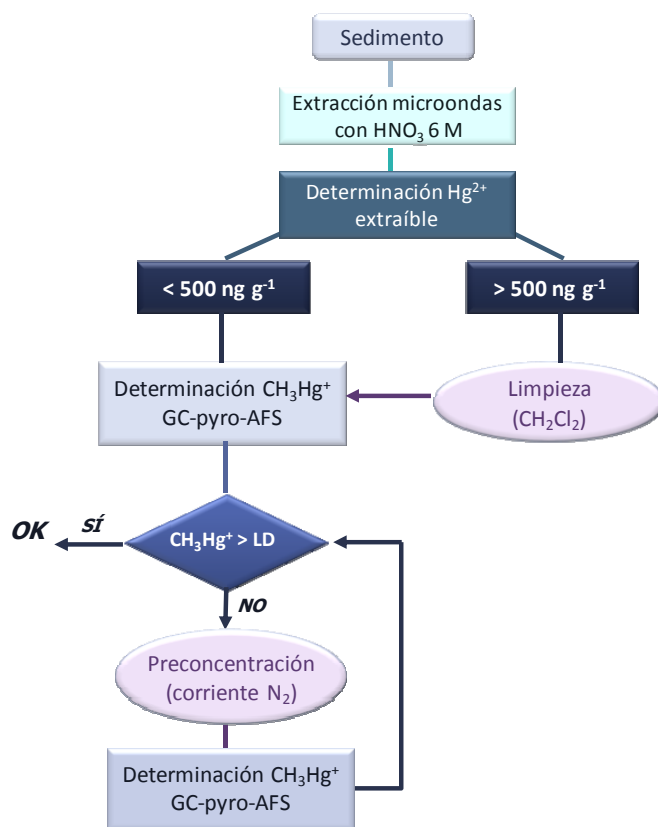


Figura 4.19. Esquema del procedimiento propuesto para la determinación de monometilmercurio en sedimentos con diferente grado de contaminación mediante GC-pyro-AFS

Como se observa en la figura anterior, una vez obtenidos los extractos ácidos tras el calentamiento por microondas, se debería determinar la cantidad de mercurio inorgánico extraíble del sedimento para saber si la etapa de limpieza es o no necesaria. De no ser así, el extracto podría ser ya derivatizado y analizado directamente por GC-pyro-AFS. En los casos en los que el monometilmercurio se encuentre por debajo de los límites de detección será necesario, además, preconcentrar las muestras ya derivatizadas. De esta manera, se logró reducir considerablemente los límites de detección y cuantificación del método que fueron de 2,6 y 8,7 ng g⁻¹ para el monometilmercurio.

La validación de este método se llevó a cabo utilizando los materiales de referencia certificados, IAEA-405 y ERM-CC-580.

Debido a la baja concentración de monometilmercurio presente en el material de referencia IAEA-405 (5,9 ng g⁻¹), para su análisis fue necesario recurrir a la etapa de preconcentración. En la *figura 4.20* se muestran los cromatogramas obtenidos para dicho material de referencia certificado antes y después de la etapa de preconcentración. Como se observa en estas figuras, el monometilmercurio sólo se puede detectar y, por tanto, cuantificar en el extracto preconcentrado.

A pesar de que la concentración de mercurio inorgánico y, más concretamente, de mercurio inorgánico extraíble en dicho sedimento no es demasiado elevada (681 ng g⁻¹), dicho valor estaría en el límite establecido para la etapa de limpieza de 500 ng g⁻¹. Por este motivo, se decidió analizar el IAEA-405 con y sin esta etapa para poder comparar los resultados. Como se puede observar en la *tabla 4.13* la recuperación obtenida para el monometilmercurio empleando sólo la preconcentración fue ya superior al 95 %, aunque fue aún más próxima al 100 % al combinar las etapas de preconcentración y limpieza. Por lo tanto, esto evidencia que el umbral de concentración establecido es un poco restrictivo pero, no obstante, se mantendrá para evitar la generación artificial de monometilmercurio independientemente de la naturaleza del sedimento analizado.

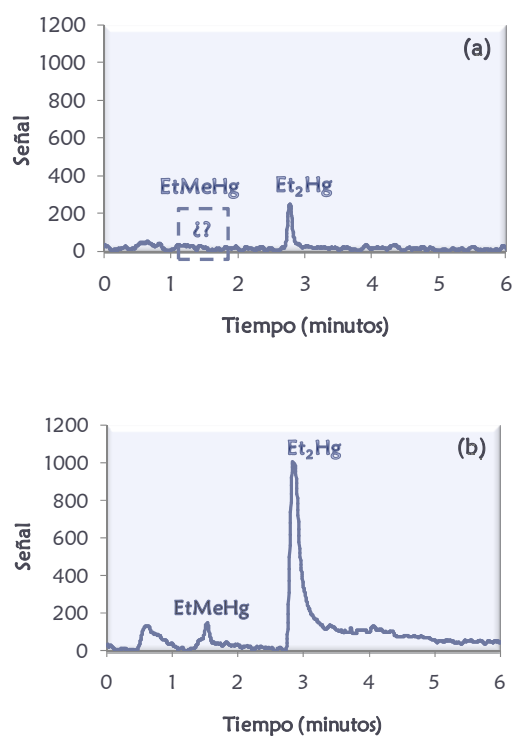


Figura 4.20. Cromatogramas obtenidos para el material de referencia certificado IAEA-405 antes (a) y después (b) de la etapa de preconcentración

Tabla 4.13. Recuperaciones de CH_3Hg^+ obtenidas para el material de referencia certificado IAEA-405 utilizando las etapas de preconcentración y limpieza

Preparación muestra	[CH ₃ Hg ⁺] certificado	[CH ₃ Hg ⁺] encontrado	
	(ng g ⁻¹)	(ng g ⁻¹)	(%)
Preconcentración	5,90±0,57	5,62±0,29	95,2
Preconcentración +Limpieza	5,90±0,57	5,90±0,86	100,0

(Incertidumbres expresadas como la desviación estándar para tres medidas independientes)

En lo que respecta al material de referencia certificado, ERM-CC-580, debido a la gran cantidad de mercurio inorgánico presente en el mismo, fue necesario realizar la extracción diferencial con diclorometano para poder determinar el monometilmercurio. Así, en los cromatogramas obtenidos para el ERM-CC-580 antes y después de limpiar los extractos con diclorometano (*figura 4.21*) se comprueba que de no haber sido reducida la cantidad de mercurio inorgánico presente en este sedimento de referencia muy contaminado no habría sido posible cuantificar el monometilmercurio debido tanto a las interferencias cromatográficas como a la generación artificial de monometilmercurio.

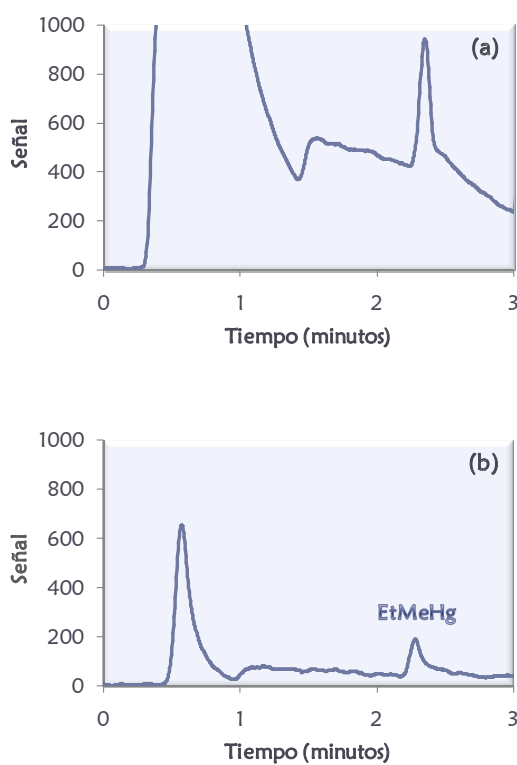


Figura 4.21. Cromatogramas obtenidos para el material de referencia certificado ERM-CC-580 antes (a) y después (b) de la etapa de limpieza

Por lo tanto, empleando la etapa de limpieza, se consiguió reducir considerablemente la cantidad de mercurio inorgánico con respecto al valor teórico encontrándose recuperaciones menores al 5 % para el mercurio inorgánico pero que fueron próximas al 100 % para el monometilmercurio, como se indica en la *tabla 4.14*.

Tabla 4.14. Resultados obtenidos en el análisis del material de referencia certificado ERM-CC-580 tras aplicar la etapa de limpieza

Muestra	[CH ₃ Hg ⁺]			[Hg ²⁺]		
	certificado (ng g ⁻¹)	encontrado (ng g ⁻¹)	(%)	certificado (μg g ⁻¹)	encontrado (μg g ⁻¹)	(%)
ERM-CC-580	75,5±3,7	73,9±2,9	97,9	132,0±3,0	5,5±1,7	4,2

(Incertidumbres expresadas como la desviación estándar para tres medidas independientes)

La exactitud del procedimiento propuesto para la determinación de monometilmercurio en sedimentos también fue evaluada estadísticamente siguiendo las pautas establecidas por diferentes organismos en guías como las de ISO (33), EURACHEM-CITAC (34) y European Reference Materials (ERM) (35), que estudian la influencia que tiene la exactitud y la precisión asociada a las medidas en la comparación de un valor certificado y uno experimental y sus correspondientes incertidumbres expandidas. Este método consiste en comparar la diferencia absoluta de concentración entre el valor medido y el valor certificado (Δm) con su incertidumbre expandida obtenida por combinación del resultado experimental y el valor certificado aplicando el correspondiente factor k (ΔU) (35).

Los resultados obtenidos (*tabla 4.15*) indicaron que tanto la concentración de monometilmercurio como la de mercurio total no presentan diferencias estadísticamente significativas respecto a las concentraciones certificadas y a sus incertidumbres expandidas ya que en todos los casos se cumplió que $\Delta m < \Delta U$, lo que confirma la exactitud de las determinaciones realizadas en estos materiales de referencia certificados.

Tabla 4.15. Resultados obtenidos en la determinación de monometilmercurio y mercurio total en los materiales de referencia IAEA-405 y ERM-CC-580

Muestra	[CH ₃ Hg ⁺]			
	Certificado (ng g ⁻¹)	Encontrado (ng g ⁻¹)	Δm	ΔU
IAEA-405	5,90±0,57	5,90±0,86	0,0	2,1
ERM-CC-580	75,5±3,7	73,9±2,9	1,1	9,9

Muestra	[Hg ²⁺] _{total}			
	Certificado (μg g ⁻¹)	Encontrado (μg g ⁻¹)	Δm	ΔU
IAEA-405	0,81±0,04	0,80±0,04	0,006	0,115
ERM-CC-580	132,0±3,0	129,0±6,5	3,0	14,4

(Incertidumbres expresadas como la desviación estándar para tres medidas independientes)

4.- CONCLUSIONES

En este capítulo se ha puesto a punto un procedimiento para la especiación de mercurio desarrollando un sistema híbrido por acoplamiento de un cromatógrafo de gases con un detector de fluorescencia atómica vía pirólisis térmica (GC-pyro-AFS). Para la determinación de forma diferenciada de las dos especies de mercurio de interés, mercurio inorgánico y monometilmercurio, se optimizó tanto la etapa de derivatización para la adecuación de las especies para su análisis por cromatografía de gases como los parámetros que influyen en el acoplamiento instrumental, alcanzándose así unos límites de detección del orden de los picogramos para ambas especies.

Asimismo, una vez puesto en marcha el sistema, se han desarrollado métodos para su aplicación a diferentes tipos de muestras medioambientales. En primer lugar, se ha puesto a punto un procedimiento para la especiación de mercurio en muestras biológicas mediante GC-pyro-AFS basado en una extracción previa de las muestras por microondas en recipientes cerrados utilizando el TMAH como agente extractante y una posterior derivatización de las muestras con tetraetilborato de sodio. Este método fue validado empleando materiales de referencia certificados, así como muestras adicionadas.

Por último, se ha desarrollado un protocolo general para la determinación de monometilmercurio en sedimentos mediante GC-pyro-AFS. Para ello se han optimizado las etapas de pretratamiento de la muestra (extracción, preconcentración y limpieza) necesarias para la extracción diferencial de las especies de mercurio, mercurio inorgánico y monometilmercurio, que se encuentran generalmente en niveles de concentración muy diferentes en los sedimentos. Así pues, en este método puede combinarse la extracción por microondas en recipientes cerrados, utilizando ácido nítrico, y la derivatización con tetraetilborato de sodio, con una etapa de preconcentración por evaporación del disolvente en una corriente de nitrógeno o una etapa de limpieza mediante una extracción diferencial con un disolvente orgánico. Además se ha establecido el papel que juega en este tipo de determinaciones la fracción de mercurio inorgánico extraíble y se ha estudiado la posible generación artificial de monometilmercurio. Este método fue finalmente validado utilizando sedimentos de referencia preparados en el laboratorio y materiales de referencia certificados, obteniendo resultados satisfactorios en todos los casos.

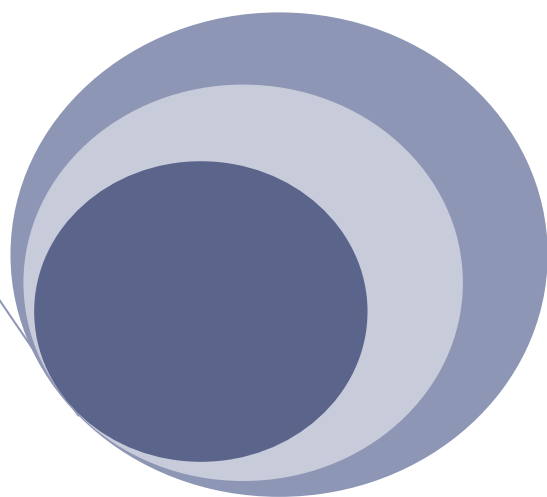
5.- BIBLIOGRAFÍA

1. **Emteborg, H., Baxter, D.C., Frech, W.** Speciation of mercury in natural waters by capillary gas chromatography with a microwave-induced plasma emission detector following preconcentration using a dithiocarbamate resin microcolumn installed in a closed flow injection system. *Analyst*. 1993, Vol. 118, p. 1007-1013.
2. **Gómez-Ariza, J.L., Lorenzo, F., García-Barrera, T., Sánchez-Rodas, D.** Analytical approach for routine methylmercury determination in seafood using gas chromatography-atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2004, Vol. 511, p. 165-173.
3. **Armstrong, H.E.L., Corns, W.T., Stockwell, P.B., Connor, G.O., Ebdon, L., Evans, E.H.** Comparison of AFS and ICP-MS detection coupled with gas chromatography for the determination of methylmercury in marine samples. *Analytica Chimica Acta*. 1999, Vol. 390, p. 245-253.
4. **Liang, L., Bloom, N.S., Horvat, M.** Simultaneous determination of mercury speciation in biological materials by GC/CVAFS after ethylation and room-temperature precollection. *Clinical Chemistry*. 1994, Vol. 40, p. 602-607.
5. **Rodríguez Martín-Doimeadios, R.C., Krupp, E., Amouroux, D., Donard, O.F.X.** Application of isotopically labeled methylmercury for isotope dilution analysis of biological samples using gas chromatography/ICPMS. *Analytical Chemistry*. 2002, Vol. 74, p. 2505-2512.
6. **Cai, Y., Monsalud, S., Furton, K.G.** Determination of methyl-mercury and ethylmercury compounds using gas chromatography atomic fluorescence spectrometry following aqueous derivatization with sodium tetraphenylborate. *Chromatographia*. 2000, Vol. 52, p. 82-86.
7. **Lorenzo García, F.** *Contribuciones a la especiación de mercurio mediante cromatografía acoplada a detectores atómicos y de masas. Aplicación a muestras medioambientales. Posibilidades de multiespeciación.* Tesis Doctoral, 2004.
8. **Rettberg, T.M., Evans Norris, S., MacIntosh, J.** Metals determinations with high accuracy and traceable uncertainty. *32nd FACSS (Federation of Analytical Chemistry & Spectroscopy Societies) / 51st ICASS (International Conference on Analytical Sciences and Spectroscopy)*. Québec, 2001.
9. **Cabañero, A.I., Madrid, Y., Cámara, C.** Evaluation of different sample pre-treatment and extraction procedures for mercury speciation in fish samples. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2002, Vol. 17, p. 1595-1601.

10. Tseng, C.M., De Diego, A., Wasserman, J.C., Amouroux, D., Donard, O.F.X. Potential interferences generated during mercury species determination using acid leaching, aqueous ethylation, cryogenic gas chromatography and atomic spectrometry detection techniques. *Chemosphere*. 1999, Vol. 39, p. 1119-1136.
11. Ebdon, L., Foulkes, M.E., Le Roux, S., Muñoz-Olivas, R. Cold vapour atomic fluorescence spectrometry and gas chromatography-pyrolysis-atomic fluorescence spectrometry for routine determination of total and organometallic mercury in food samples. *Analyst*. 2002, Vol. 127, p. 1108-1114.
12. Porcella, D.B. *Mercury in the environment: Biogeochemistry*. C.J. Watras and J.W. Huckabee. Boca Raton: Ed. Lewis Publishers, 1994. p. 3-19.
13. Leermakers, M., Baeyens, W., Quevauviller, P., Horvat, M. Mercury in environmental samples: speciation, artifacts and validation. *Trends in Analytical Chemistry*. 2005, Vol. 24, p. 383-393.
14. Hiltelmann, H., Falter, R., Ilgen, G., Evans, R.D. Determination of artifactual methylmercury (CH_3Hg^+) formation in environmental samples using stable Hg^{2+} isotopes with ICP-MS detection: Calculation of contents applying species specific isotope addition. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. 1997, Vol. 57, p. 363-370.
15. Falter, R., Hiltelmann, H., Quevauviller, P. Conclusion of the workshop on "Sources of error in methylmercury determination during sample preparation, derivatisation and detection". *Chemosphere*. 1999, Vol. 39, p. 1039-1049.
16. Rahman, G.M.M., Kingston, H.M.S. Development of a microwave-assisted extraction method and isotopic validation of mercury species in soils and sediments. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2005, Vol. 20, p. 183-191.
17. Vázquez, M.J., Carro, A.M., Lorenzo, R.A., Cela, R. Optimization of methylmercury microwave-assisted extraction from aquatic sediments. *Analytical Chemistry*. 1997, Vol. 69, p. 221-225.
18. Tseng, C.M., de Diego, A., Martín, F.M., Donard, O.F.X. Rapid and quantitative microwave-assisted recovery of methylmercury from standard reference sediments. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 1997, Vol. 12, p. 629-635.
19. Rodríguez Martín-Doimeadios, R.C., Monperrus, M., Krupp, E., Amouroux, D., Donard, O.F.X. Using speciated isotope dilution with GC-inductively coupled plasma MS to determine and unravel the artificial formation of monomethylmercury in certified reference sediments. *Analytical Chemistry*. 2003, Vol. 75, p. 3202-3211.

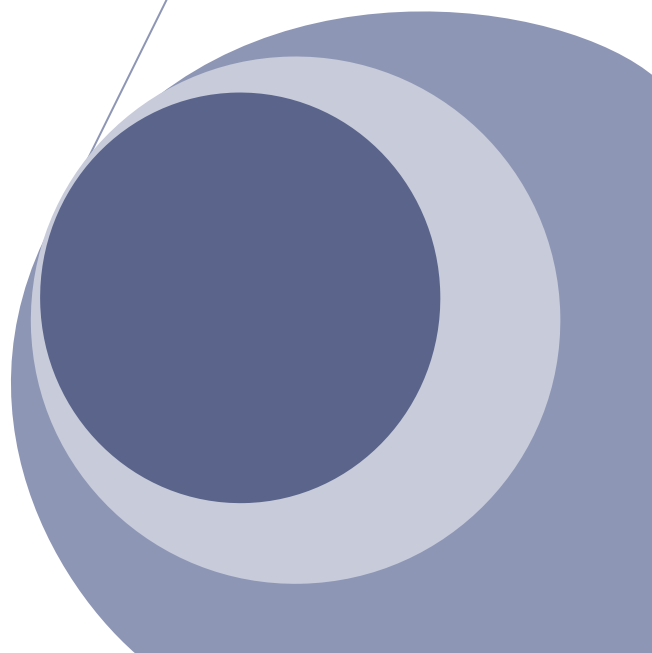
20. **Quevauviller, Ph.** Certification of methylmercury in sediment: from controversial facts to scientific evidence. *Chemosphere*. 1999, Vol. 39(7), p. 1153-1165.
21. **Quevauviller, P., Filippelli, M., Horvat, M.** Method performance evaluation for methylmercury determination in fish and sediment. *Trends in Analytical Chemistry*. 2000, Vol. 19, p. 157-166.
22. **Ramalhosa, E., Rio Segade, S., Pereira, E., Vale, C., Duarte, A.** Microwave assisted extraction for methylmercury determination in sediments by high performance liquid chromatography cold vapour atomic fluorescence spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2001, Vol. 16, p. 643-647.
23. **Craig, P.J.** *Organometallic compounds in the environment, principles and reactions*. Essex: Ed. Longman, 1986.
24. **Kocman, D., Horvat, M., Kotnik, J.** Mercury fractionation in contaminated soils from the Idrija mercury mine region. *Journal of Environment Monitoring*. 2004, Vol. 6, p. 696-703.
25. **Han, Y., Kingston, H.M., Boylan, H.M., Rahman, G.M.M., Shah, S., Richter, R.C., Link, D.D., Bhandari, S.** Speciation of mercury in soil and sediment by selective solvent and acid extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2003, Vol. 375, p. 428-436.
26. **Quevauviller, Ph., Horvat, M.** Artifact formation of methylmercury in sediments. *Analytical Chemistry*. 1999, Vol. 71, p. 155A-156A.
27. **Bloom, N.S., Colman, J.A., Barber, L.** Formation of methylmercury during aqueous distillation and alternative techniques for the extraction of methylmercury from environmental samples. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. 1997, Vol. 358, p. 371-377.
28. **Horvat, M., Bloom, N., Liang, L.** Comparison of distillation with other current isolation methods for the determination of methylmercury compounds in low level environmental samples, Part I: Sediments. *Analytica Chimica Acta*. 1993, Vol. 281, p. 135-152.
29. **Hammerschmidt, C.R., Fitzgerald, W.F.** Formation of artifact methylmercury during extraction from a sediment reference material. *Analytical Chemistry*. 2001, Vol. 73, p. 5930-5936.

30. Delgado, A., Prieto, A., Zuloaga, O., De Diego, A., Madariaga, J.M. Production of artifact methylmercury during the analysis of certified reference materials: Use of ionic exchange in the sample pretreatment step to minimise the problem. *Analytica Chimica Acta*. 2007, Vol. 582, p. 109-115.
31. Liang, L., Horvat, M., Cernichiari, E., Gelein, B., Balogh, S. Simple solvent extraction technique for elimination of matrix interferences in the determination of methylmercury in environmental and biological samples by ethylation-gas chromatography-cold vapor atomic fluorescence spectrometry. *Talanta*. 1996, Vol. 43, p. 1883-1888.
32. Canário, J., Antunes, P., Lavrado, J., Vale, C. Simple method for monomethylmercury determination in estuarine sediments. *Trends in Analytical Chemistry*. 2004, Vol. 23(10-11), p. 799-806.
33. ISO. *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*. 1993.
34. EURACHEM. *EURACHEM/CITAC Guide*. 2000.
35. Linsinger, T. *Application Note: Comparison of a measurement result with the certified value*. 2005. www.erm-crm.org.



Capítulo V

Especiación simultánea de
mercurio y estaño por GC-MS



1.- PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

En los últimos años, se han introducido en las políticas nacionales o internacionales algunas regulaciones que hacen referencia a la necesidad de determinar no sólo el contenido total sino también las diferentes especies en las que puede presentarse un contaminante. Esta problemática se manifiesta en el caso de compuestos orgánicos de elementos como mercurio y estaño, cuya relevancia medioambiental o toxicológica es muy superior a la de sus correspondientes formas inorgánicas. Así, en el caso del mercurio el compuesto más importante es el monometilmercurio mientras que dentro de los compuestos orgánicos de estaño destacan los compuestos butilados (mono-, di- y tri- butilestaño), siendo el más tóxico de todos ellos el tributilestaño (TBT). Éste último ha sido extensamente utilizado como biocida en pinturas especiales para barcos causando de esta forma importantes daños en pequeños organismos a partir de los cuales comienza su bioacumulación a lo largo de la cadena trófica. Todo ello ha derivado en la inclusión del mercurio y sus compuestos, así como del TBT y sus productos de degradación, en la lista de principales contaminantes elaborada por la Unión Europea. Por este motivo, parece interesante el desarrollo de métodos de especiación que permitan el análisis simultáneo de estos contaminantes.

Haciendo una revisión bibliográfica, se comprueba que sólo existen tres aplicaciones recientes en las que se determinaron simultáneamente compuestos organometálicos de estaño, mercurio y plomo (1-3). Todas ellas fueron realizadas utilizando un sistema híbrido formado por un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente (GC-ICP-MS). Esta técnica, a pesar de ser muy sensible, presenta ciertas desventajas en cuanto a su alto coste (tanto en su adquisición como en su mantenimiento), su sofisticación (ya que sólo puede ser utilizada por personal cualificado para ello) y su difícil disponibilidad pues solamente se han comercializado hasta el momento dos interfaces GC-ICP-MS. Por este motivo, el empleo de esta técnica sería caro y dificultoso para los análisis de rutina por lo que sería interesante poder utilizar otros sistemas

más extendidos como es el acoplamiento de la cromatografía de gases con un espectrómetro de masas (GC-MS).

La mayor parte de los procesos que pueden dificultar la especiación de compuestos organometálicos en muestras medioambientales (extracción incompleta de las especies desde las matrices sólidas, pérdidas de la muestra, reacciones de intercambio durante la extracción y/o la derivatización, bajas recuperaciones o derivas de la señal), a excepción de la extracción incompleta, pueden ser estudiados y/o corregidos gracias al empleo de los análisis por dilución isotópica (IDA) (4). Estos análisis pueden ser aplicados tanto a la determinación de compuestos como de elementos. Así, en los últimos años, esta técnica se ha extendido bastante en nuevos campos como el de la especiación elemental que engloba los análisis elementales y orgánicos. De esta manera, el uso de isótopos enriquecidos ha servido, por ejemplo, para el marcaje de compuestos organometálicos como el monometilmercurio. Por tanto, la combinación de la dilución isotópica con las técnicas de masas permitiría alcanzar una buena exactitud y precisión en la determinación de un gran número de especies elementales en matrices complicadas, produciéndose así una reducción considerable del tiempo de análisis (5). Además, añadiendo diferentes especies enriquecidas isotópicamente de elementos distintos, se haría posible la determinación simultánea de cada una de dichas especies en una misma muestra (4). Por tanto, la posibilidad de aplicar un mismo procedimiento de preparación de la muestra para determinar diferentes especies de diferentes elementos sería muy ventajosa, especialmente en los casos en el que el número de muestras a analizar fuera elevado.

Atendiendo a todo lo anterior, se decidió desarrollar un método para la determinación simultánea de monometilmercurio (CH_3Hg^+), mono-, di- y tributilestaño (MBT, DBT y TBT, respectivamente) en diferentes tipos de muestras medioambientales mediante GC-MS utilizando la técnica de dilución isotópica específica. Para ello se optimizaron primeramente las condiciones del sistema para lograr relaciones isotópicas precisas y exactas. Asimismo, se trató de encontrar un procedimiento de preparación de

muestra común para la determinación de todos los compuestos de interés de ambos elementos. Para ello, se estudiaron tanto la etapa de extracción como los posibles procedimientos de limpieza (uso de Florisil o la microextracción en fase sólida) con el fin de minimizar la co-elución de compuestos orgánicos interferentes. La metodología desarrollada fue validada, en primer lugar, analizando materiales de referencia certificados para compuestos butilados de estaño (CRM-477 y SOPH-1) o monometilmercurio (BCR-464). Por último, se procedió a validar la determinación simultánea de especies de mercurio y estaño utilizando aguas naturales fortificadas con diferentes niveles de concentración de los compuestos estudiados y el material de referencia BCR-710 certificado para tributilestaño y monometilmercurio.

2.- MEDIDA DE LAS RELACIONES ISOTÓPICAS POR GC-MS

2.1 DILUCIÓN ISOTÓPICA Y GC-MS

La dilución isotópica es una técnica analítica basada en la medida de las relaciones entre los isótopos en muestras donde la composición isotópica ha sido alterada por adición de una cantidad conocida de un elemento enriquecido isotópicamente denominado trazador o *spike*. Por tanto, el elemento a analizar debe presentar al menos dos isótopos estables o de larga vida media radiactiva que puedan ser medidos en un espectrómetro de masas libre de interferencias espectrales. El fundamento de este tipo de análisis se ilustra en la *figura 5.1* para un elemento que posee dos isótopos a y b. Como puede observarse, el isótopo a es el más abundante en la muestra mientras que el trazador está enriquecido isotópicamente en el isótopo b. Por tanto, la abundancia de los dos isótopos y la relación isotópica en la mezcla o muestra final serán intermedias entre las que presenta el trazador y las de la muestra y van a depender tanto de la cantidad del trazador añadido como de la cantidad inicial del elemento en la mezcla.

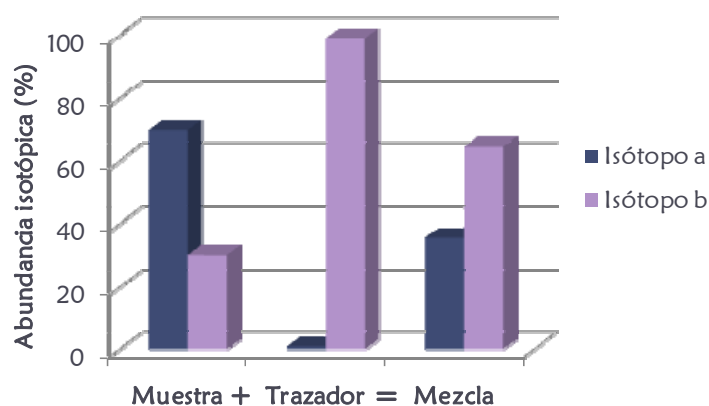


Figura 5.1. Ilustración del fundamento del análisis por dilución isotópica para un elemento que contiene dos isótopos diferentes a y b

Las relaciones isotópicas pueden expresarse matemáticamente mediante una serie de ecuaciones que rigen la dilución isotópica. La ecuación principal que determina la concentración del elemento buscado en la muestra (c_s) tendría la siguiente forma (6):

$$c_s = c_{sp} \frac{m_{sp}}{m_s} \frac{M_s}{M_{sp}} \frac{A_{sp}^b}{A_s^a} \left(\frac{R_m - R_{sp}}{1 - R_m R_s} \right)$$

Donde:

- c_s y c_{sp} son las concentraciones del elemento en la muestra y en el trazador, respectivamente
- m_s y m_{sp} son las masas tomadas de la muestra inicial y el trazador en la mezcla de ambos, respectivamente
- M_s y M_{sp} son los pesos atómicos del elemento en la muestra y el trazador, respectivamente
- A_s^a y A_s^b son las abundancias isotópicas de los isótopos a y b en la muestra
- A_{sp}^a y A_{sp}^b son las abundancias isotópicas de los isótopos a y b en el trazador

- R_s , R_{sp} y R_m son las relaciones isotópicas de ambos isótopos (a/b) en la muestra, en el trazador o en la mezcla de ambos, respectivamente

Al contrario de otras técnicas analíticas, la ecuación anterior no contiene ningún factor relacionado con la sensibilidad instrumental lo que le hace inmune a cambios debidos a deriva instrumental o efectos de matriz. Además, la incertidumbre en la concentración medida por dilución isotópica depende únicamente de la incertidumbre en la medida de las relaciones isotópicas R_s , R_{sp} y R_m . Por tanto, para determinar la concentración de un elemento en una muestra lo más importante es la medida de las relaciones isotópicas pues el resto de parámetros serán conocidos o se podrían medir experimentalmente sin dificultad.

Las relaciones isotópicas en la mezcla (R_m) de la muestra inicial y el trazador se podrían calcular según la siguiente expresión (6):

$$R_m = \frac{N_m^a}{N_m^b} = \frac{N_s^a + N_{sp}^a}{N_s^b + N_{sp}^b} = \frac{N_s A_s^a + N_{sp} A_{sp}^a}{N_s A_s^b + N_{sp} A_{sp}^b}$$

Donde:

- N_s^a y N_s^b son los moles de los isótopos a y b en la muestra inicial
- N_{sp}^a y N_{sp}^b son los moles de los isótopos a y b en el trazador
- N_m^a y N_m^b son los moles de los isótopos a y b en la mezcla
- N_s y N_{sp} representan el número de moles del elemento poli-isotópico estudiado en la muestra o en el trazador, respectivamente

De forma análoga se podrían calcular las relaciones isotópicas entre los isótopos a y b tanto en la muestra inicial (R_s) como en el trazador (R_{sp}).

Así pues, una vez establecido el equilibrio isotópico en la mezcla de muestra y trazador, cualquier alícuota de ésta tendrá la misma relación R_m . Por lo tanto, los procesos de separación no cuantitativos no van a tener influencia en el resultado final. Asimismo no va a ser necesario conocer los factores de dilución o preconcentración realizados. Estas características hacen de la dilución isotópica un método absoluto de análisis al mismo nivel que la gravimetría, volumetría y coulombimetría (7).

Dentro de la dilución isotópica podrían distinguirse dos formas de realizar la adición en función de cuándo y en qué forma química se añadiera el marcador isotópico a la muestra: específica (*species-specific*) o inespecífica (*species-inspecific*) (8). En el modo inespecífico el marcador se añade al final del proceso por lo que éste puede encontrarse en una forma química diferente a la especie a determinar. Los únicos requisitos que deben cumplirse para su aplicación son que no se produzcan pérdidas de sustancias antes de la adición y que entre los analitos y el *trazador* se produzca una mezcla completa antes del proceso de ionización, para lograr así medir adecuadamente la correspondiente relación isotópica. Por tanto, este modo es útil cuando no se conoce exactamente la estructura o composición de las especies o cuando los correspondientes compuestos isotópicamente marcados no se encuentran disponibles comercialmente o no pueden ser sintetizados. Así pues, este modo, a pesar de que presenta el inconveniente de no permitir la corrección de las pérdidas que se producen antes de la separación cromatográfica, es la única alternativa para la cuantificación cuando no se dispone de un estándar que contenga los analitos. A diferencia del modo anterior, en la adición específica la composición y estructura de las especies de interés debe ser perfectamente conocida para poder sintetizar las correspondientes especies enriquecidas isotópicamente o bien adquirir la disolución adecuada si está disponible comercialmente. En este modo el trazador es añadido desde el principio del proceso analítico lo que permite disfrutar de todas las ventajas que ofrecen los análisis por dilución isotópica una vez que se ha producido la mezcla entre la muestra inicial y la disolución adicionada.

Las relaciones isotópicas pueden ser obtenidas fácilmente utilizando el acoplamiento GC-ICP-MS. Sin embargo, la medida de dichas relaciones no es tan directa en el caso de utilizar GC-MS (9). Esto se debe a que los espectros de masas obtenidos con GC-MS son mucho más complejos debido a que el impacto electrónico produce iones moleculares. El modelo isotópico de los iones moleculares es diferente del modelo elemental esperado debido a las contribuciones de los grupos orgánicos ligados al metal que contienen ^{13}C , ^2H , ^{15}N o ^{18}O . Estos isótopos, a pesar de presentar abundancias naturales muy bajas, pueden originar picos correspondientes a $[\text{M}+1]^+$ o $[\text{M}+2]^+$ para iones con masas moleculares altas. Además, la posible elución de compuestos orgánicos a los mismos tiempos de retención de los analitos podría producir interferencias lo que constituiría una importante fuente de error.

Para solucionar estos problemas habría que adoptar varias medidas. Por un lado, las interferencias anteriormente expuestas parecen indicar la necesidad de incorporar una etapa de limpieza al final del proceso de preparación de la muestra para minimizar la co-elución de compuestos orgánicos, especialmente en el análisis de matrices complejas. Por otro lado, habría que desarrollar ecuaciones matemáticas que permitieran corregir la contribución de los iones moleculares $[\text{M}+1]^+$ o $[\text{M}+2]^+$, utilizando la abundancia isotópica natural del ^{13}C (1,1 %) (9) o bien aplicando factores de corrección obtenidos por medida de las relaciones isotópicas naturales de las especies de interés en estándares o muestras no adicionadas (10). La primera estrategia resuelve el problema simplemente adquiriendo fragmentos adicionales libres de la contribución del ^{13}C en el modo de monitorización de los iones seleccionados o modo SIM. Sin embargo, la segunda implica la medida adicional y la preparación de soluciones con la misma matriz pero que no estén marcadas para calcular la desviación en la medida de las relaciones isotópicas naturales, por lo que en los últimos años apenas ha sido utilizada. No obstante, pese a que la primera opción ofrece buenos resultados, recientemente se ha llegado a otras aproximaciones matemáticas alternativas como el desarrollo de modelos isotópicos por reconstrucción de ciertos algoritmos, que ya ha sido aplicado para la medida de relaciones isotópicas por GC-MS (11).

2.2 OPTIMIZACIÓN DE LA MEDIDA DE LAS RELACIONES ISOTÓPICAS POR GC-MS

El trabajo presentado en este capítulo se llevó a cabo utilizando un sistema de cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) como el que se muestra en la *figura 5.2*. Dicho sistema instrumental está formado por un cromatógrafo de gases modelo HP-5890 de Agilent Technologies (Tokio, Japón) acoplado a un espectrómetro de masas modelo JMS-Q1000GC de JEOL (Tokio, Japón) que posee un cuadrupolo como detector.



Figura 5.2. Sistema de cromatografía de gases y espectrometría de masas

La calibración de masas del equipo se realizó utilizando el espectro de masas del PFTBA (perfluorotributilamina), que permite la calibración del equipo en un amplio intervalo de masas, siendo los picos más intensos los correspondientes a las masas 69, 218 y 502. Por tanto, estos picos suelen ser los seleccionados para dicha calibración. Para ello se utilizaron las opciones de “autotune” o “manual tune” del instrumento que permiten el ajuste automático o manual de los parámetros relativos a la calibración de masas, la extracción, enfoque, aceleración y detección de los iones de tal manera que se obtenga la mejor forma de pico triangular y simétrica, la mayor sensibilidad de los mismos y una determinada resolución, quedando así optimizados los parámetros electrónicos de mayor importancia como los potenciales de las lentes o el voltaje del detector.

La medida de las relaciones isotópicas con este sistema GC-MS en las especies de mercurio y estaño de mayor relevancia medioambiental (CH_3Hg^+ , MBT, DBT y TBT) se llevó a cabo siguiendo una metodología basada en la utilizada por Centineo et al. (2004) en un trabajo en el que se determinaron compuestos organoestánicos por GC-MS (9) y que también fue aplicada para compuestos organomercuriales en un trabajo posterior (12). Con dichas medidas se pretendía lograr la determinación simultánea de los compuestos de mercurio y estaño estudiados en una misma muestra. Por ello se comprobaron las condiciones instrumentales del sistema y se optimizaron algunos parámetros tratando de obtener una adecuada separación de los picos cromatográficos, así como relaciones isotópicas lo más precisas y exactas posible.

2.2.1 SELECCIÓN DE LAS MASAS A MONITORIZAR

Antes de proceder a seleccionar el cluster molecular o el fragmento del ion más adecuado para trabajar por dilución isotópica con GC-MS, fue necesario establecer cómo iban a ser derivatizadas las muestras, para conocer las posibles fragmentaciones que iban a poder darse. Atendiendo a la bibliografía consultada, las opciones que se barajaron fueron la etilación (9) o la propilación (12) con tetraetil- o tetrapropil- borato de sodio, respectivamente. La derivatización de patrones con las especies de mercurio y estaño mostró un importante co-elución de compuestos interferentes cuando las muestras eran propiladas. Además, en este caso, el pico correspondiente al monometilmercurio se veía especialmente interferido, en contraste a lo publicado en uno de los trabajos revisados (12). Por lo tanto, atendiendo a los resultados obtenidos, se decidió etilar las muestras utilizando tetraetilborato de sodio.

Sabiendo que las especies que llegarán al detector son los derivados etilados de los cationes de interés, se pasó a estudiar las posibles fragmentaciones que podían sufrir en la fuente de impacto electrónica. Así, se comprobó que las fragmentaciones previamente seleccionadas en los dos trabajos indicados (9, 12), es decir, M-29 (pérdida de un grupo etilo) para los

compuestos butilados de estaño y el ion molecular M para el monometilmercurio llevaron a la mayor exactitud en la medida de las relaciones isotópicas de las abundancias naturales en comparación con otros clústeres estudiados. Por tanto, las masas monitorizadas para estos compuestos en los clústeres moleculares seleccionados fueron las que se indican en la *tabla 5.1*.

Tabla 5.1. Masas monitorizadas para MBT, DBT, TBT, CH_3Hg^+ y Hg^{2+} en los clústeres moleculares seleccionados

Isótopos de Sn	MBT (BuEt_2Sn^+)	DBT (Bu_2EtSn^+)	TBT (Bu_3Sn^+)	Isótopos de Hg	CH_3Hg^+ (MeEtHg)	Hg^{2+} (Et_2Hg)
116	231	259	287	198	242	256
117	232	260	288	199	243	257
118	233	261	289	200	244	258
119	234	262	290	201	245	259
120	235	263	291	202	246	260

2.2.2 OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS

Para la separación, se utilizó una columna capilar apolar DB-5MS de Agilent J&W Scientific (Folsom, CA, USA) compuesta por 5 % de difenilsiloxano y 95 % de dimetilsiloxano y unas dimensiones de 30 m x 0,25 mm de diámetro interno x 0,25 μm de relleno. Asimismo el cromatógrafo dispone de un inyector que puede operar en modo split o splitless aunque las inyecciones fueron realizadas sin división de flujo (modo splitless) y a una temperatura del inyector de 250 $^{\circ}\text{C}$. Como gas portador se utilizó helio con un flujo constante de 1,0 mL min^{-1} . Una vez fijados estos parámetros se procedió a estudiar el programa de temperaturas tratando de obtener picos estrechos y bien resueltos.

En principio, se comprobó el programa utilizado en dos de los trabajos consultados (9, 12), es decir, una temperatura inicial de 50 $^{\circ}\text{C}$

mantenida durante 1 minuto llegando a una temperatura final de 300 °C a 30 °C min⁻¹. Sin embargo, se observó que con esta temperatura inicial no se lograba un pico bien definido para el monometilmercurio, que es la primera especie que se eluye debido a que las muestras han sido previamente etiladas. Por este motivo, se decidió probar el efecto que tendría utilizar temperaturas iniciales inferiores, especialmente en la forma de dicho pico. Se probaron tres temperaturas, 40, 35 y 30 °C, observándose que la que ofrecía mejores resultados en cuanto a forma y resolución de los picos fue la de 40 °C. Así pues, se pasó a estudiar el efecto de la velocidad de rampa y se comprobó que disminuyendo dicha velocidad a 15 °C min⁻¹ se lograba un pico más estrecho para el monometilmercurio. Asimismo se redujo la temperatura final para acortar el tiempo de análisis. Por lo tanto, finalmente se seleccionó un programa de temperaturas en dos etapas con una primera rampa a 15 °C min⁻¹, desde los 40 °C iniciales hasta 90 °C para la elución de los compuestos de mercurio, y una segunda a 30 °C min⁻¹ hasta llegar a una temperatura final de 280 °C. Trabajando en estas condiciones se logró separar en menos de siete minutos las dos principales especies de mercurio (CH₃Hg⁺ y Hg²⁺) y los tres compuestos butilados de estaño (MBT, DBT y TBT) obteniéndose picos estrechos y bien resueltos como se muestra en la *figura 5.3* donde se presenta un cromatograma de las cinco especies determinadas por el sistema GC-MS.

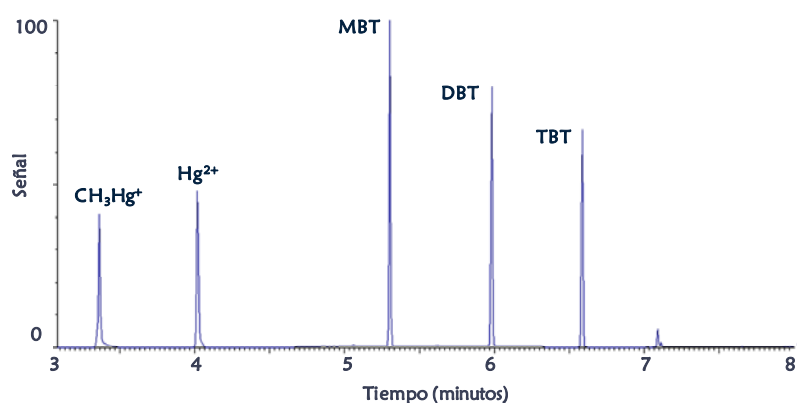


Figura 5.3. Cromatograma de un patrón de 100 µg L⁻¹ de concentración de las especies de mercurio y estaño determinadas simultáneamente por GC-MS

2.2.3 CORRECCIÓN DE LA CONTRIBUCIÓN DE ^{13}C : APLICACIÓN DE ECUACIONES DE CORRECCIÓN

Las relaciones isotópicas medidas pueden verse afectadas por la contribución de isótopos como ^{13}C y ^2H , apareciendo picos interferentes para M+1 y M+2, como ya se indicó en el apartado 2.1 de este capítulo. Asumiendo que en nuestro caso la contribución de ^2H era despreciable, se corrigió la contribución de ^{13}C mediante las siguientes ecuaciones en las que se tiene en cuenta la abundancia natural del ^{13}C (1,1 %) (9):

$$I_{M+1} = I_M \cdot n \cdot x_{^{13}\text{C}}$$

$$I_{M+2} = I_M \cdot \frac{1}{2} n (n - 1)^2 (x_{^{13}\text{C}})^2$$

Donde:

- n es el número de átomos de C en el fragmento molecular
- $x_{^{13}\text{C}}$ es la abundancia relativa de ^{13}C respecto a ^{12}C
- I_M , I_{M+1} e I_{M+2} son las intensidades de los iones M, M+1 y M+2, respectivamente

Las contribuciones de M+1 y M+2 de los compuestos butilados de estaño fueron corregidas monitorizando los cinco iones moleculares para cada analito indicados en la *tabla 5.1*, es decir, los isótopos ^{116}Sn , ^{117}Sn , ^{118}Sn , ^{119}Sn y ^{120}Sn . Para medir la intensidad de la señal correspondiente a los isótopos 118, 119 y 120 va a ser necesario monitorizar también los isótopos 116 y 117 ya que la intensidad medida se corrige teniendo en cuenta las contribuciones de las masas M+1 y M+2. Como las contribuciones de ^{114}Sn y ^{115}Sn pueden ser consideradas despreciables debido a sus bajas abundancias naturales se puede, por tanto, considerar que la intensidad de la señal medida para ^{116}Sn está libre de las contribuciones de M+1 y M+2. Así, las ecuaciones de corrección de las intensidades (*I*) para el estaño quedaron de la siguiente forma:

$$\begin{aligned} {}^{116}\text{Sn} &= {}^{116}\text{I} \\ {}^{117}\text{Sn} &= {}^{117}\text{I} - x ({}^{116}\text{Sn}) \\ {}^{118}\text{Sn} &= {}^{118}\text{I} - x ({}^{117}\text{Sn}) - y ({}^{116}\text{Sn}) \\ {}^{119}\text{Sn} &= {}^{119}\text{I} - x ({}^{118}\text{Sn}) - y ({}^{117}\text{Sn}) \\ {}^{120}\text{Sn} &= {}^{120}\text{I} - x ({}^{119}\text{Sn}) - y ({}^{118}\text{Sn}) \end{aligned}$$

Donde x es el factor de contribución de M+1 e y el factor de contribución de M+2.

En el caso de los compuestos de mercurio, monometilmercurio y mercurio inorgánico, se procedió de manera análoga que para los compuestos de estaño. Así pues, las intensidades de la señal medida fueron corregidas monitorizando los cinco clústeres seleccionados para el mercurio, correspondientes a los isótopos ^{198}Hg , ^{199}Hg , ^{200}Hg , ^{201}Hg y ^{202}Hg , teniendo en cuenta las contribuciones de ^{13}C para M+1 y M+2, aunque generalmente para el monometilmercurio la contribución de M+2 suele ser prácticamente despreciable. Debido a que el isótopo ^{197}Hg no existe y a la abundancia natural tan pequeña de ^{196}Hg (0,15 %), el ion molecular correspondiente al isótopo ^{198}Hg estará libre de la contribución del ^{13}C . Por tanto, las ecuaciones utilizadas para corregir las intensidades (I) medidas en el caso del mercurio fueron:

$$\begin{aligned} {}^{198}\text{Hg} &= {}^{198}\text{I} \\ {}^{199}\text{Hg} &= {}^{199}\text{I} - x ({}^{198}\text{Hg}) \\ {}^{200}\text{Hg} &= {}^{200}\text{I} - x ({}^{199}\text{Hg}) - y ({}^{198}\text{Hg}) \\ {}^{201}\text{Hg} &= {}^{201}\text{I} - x ({}^{200}\text{Hg}) - y ({}^{199}\text{Hg}) \\ {}^{202}\text{Hg} &= {}^{202}\text{I} - x ({}^{201}\text{Hg}) - y ({}^{200}\text{Hg}) \end{aligned}$$

Donde x es el factor de contribución de M+1 e y el factor de contribución de M+2.

Los factores de contribución de M+1 y M+2, es decir, x e y en las ecuaciones anteriores, se calcularon teniendo en cuenta la abundancia natural del ^{13}C (1,1 %) según las siguientes expresiones:

$$x = n \cdot \frac{A_{13C}}{100}$$

$$y = \frac{1}{2}n^2 \cdot \frac{(A_{13C})^2}{100}$$

Donde:

- n es el número de átomos de C en el fragmento molecular
- A_{13C} es la abundancia natural del ^{13}C

Por tanto, la probabilidad en tanto por uno de la aparición de M+1 y M+2 para el fragmento M-29 en el caso de los compuestos butilados de estaño y M para los compuestos de mercurio se corresponde con los factores de contribución para estos iones cuyos valores se recogen en la *tabla 5.2*.

Tabla 5.2. Factores de contribución de M+1 y M+2 para MBT, DBT, TBT y CH_3Hg^+ en los clústeres moleculares seleccionados

Factor	MBT (BuEt_2Sn) ⁺	DBT (Bu_2EtSn) ⁺	TBT (Bu_3Sn) ⁺	CH_3Hg^+ (MeEtHg)	Hg^{2+} (Et_2Hg)
$x (M+1)$	0,088	0,110	0,132	0,033	0,044
$y (M+2)$	0,0038	0,0060	0,0086	0,00054	0,00096

2.2.4 OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DEL ESPECTRÓMETRO DE MASAS

Los parámetros del espectrómetro de masas fueron optimizados con el fin de alcanzar la máxima exactitud y precisión en la medida de las relaciones isotópicas de Sn y Hg. Tanto la temperatura de la fuente de iones como de la línea de transferencia que conecta el detector con el cromatógrafo de gases adoptaron unos valores prefijados de 250 °C y 280 °C, respectivamente. Por otro lado, las medidas se llevaron a cabo trabajando a una resolución para las masas de 1000, al ser éste el valor que ofrecía una mayor relación señal/ruido en los experimentos previos que se

realizaron a 1000, 1125 y 1250 V. Finalmente, se evaluaron tanto la energía de ionización como el efecto del tiempo de integración (*dwell time*). Ambos parámetros se estudiaron en primer lugar para los compuestos de estaño y mercurio por separado y posteriormente trataron de encontrarse unos valores óptimos que permitieran una adecuada medida de las relaciones isotópicas en las determinaciones simultáneas.

2.2.4.1 Energía de ionización

En el espectrómetro de masas utilizado, la ionización se llevó a cabo por impacto electrónico. En este modo de ionización las moléculas se ionizan debido a la colisión de las mismas con electrones de alta energía que son emitidos por el filamento de wolframio que se encuentra a una determinada diferencia de potencial con respecto al colector. De esta manera la energía de los iones emitidos será igual a dicha diferencia de potencial pero expresada en forma de eV. En principio, la energía de ionización es un parámetro que normalmente suele presentar un valor prefijado de 70 eV (9, 12), lo que corresponde a una diferencia de potencial de -70 V. Sin embargo, tratando de mejorar la medida de las relaciones isotópicas, especialmente en el caso de los compuestos de mercurio, se decidió estudiar este parámetro. En el caso de los compuestos butilados de estaño se varió sólo en un pequeño intervalo de 60 a 80 eV, ya que en base a experiencias previas cabía esperar que la influencia no fuera muy destacada. Para evaluar su efecto se calcularon las relaciones isotópicas de los isótopos ^{120}Sn y ^{118}Sn respecto al ^{119}Sn y se compararon los valores obtenidos con la relación teórica que existe entre las abundancias naturales de estos isótopos. Por último, se halló el error cometido en cada una de estas comparaciones.

Los resultados obtenidos (*tabla 5.3*) muestran como, en la mayoría de los casos, los mejores resultados se obtuvieron para la energía de ionización de 70 eV. Además como no se observó ninguna tendencia clara al aumentar o disminuir dicho valor, se decidió no ampliar el intervalo de estudio de este parámetro para el Sn.

Tabla 5.3. Efecto de la energía de ionización en los porcentajes de error de las relaciones isotópicas calculados respecto a las relaciones teóricas para los compuestos butilados de estaño

Energía de ionización (eV)	MBT		DBT		TBT	
	120/119	118/119	120/119	118/119	120/119	118/119
60	4,910	2,569	3,802	1,647	0,955	0,051
70	3,802	1,966	0,744	0,765	0,691	0,299
80	1,720	3,740	2,247	0,512	1,799	0,406

En el caso del mercurio, la energía de ionización se estudió en un intervalo mayor comprendido entre 40 y 80 eV ya que se observó que la disminución de dicho parámetro tenía una cierta influencia en el cálculo de algunas relaciones isotópicas, especialmente para el monometilmercurio. Los errores obtenidos en el cálculo de las distintas relaciones isotópicas respecto a las teóricas (*tabla 5.4*) indicaron que el valor óptimo para los compuestos de mercurio sería de 40 eV.

Tabla 5.4. Efecto de la energía de ionización en los porcentajes de error de las relaciones isotópicas calculados respecto a las relaciones teóricas para las especies de mercurio

Energía de ionización (eV)	CH ₃ Hg ⁺			Hg ²⁺		
	199/202	200/202	201/202	199/202	200/202	201/202
40	0,393	0,894	2,113	0,463	0,407	0,408
50	0,840	0,130	2,655	0,315	0,306	0,697
60	1,344	0,632	2,802	1,090	0,958	0,256
70	1,238	0,417	2,711	0,465	0,436	0,239
80	2,438	1,398	2,862	0,263	0,755	0,285

Pese a que para el mercurio las energías de ionización que ofrecieron mejores resultados fueron las menores (40 y 50 eV), si se consideran los valores restantes comprendidos entre 60 y 80 eV, los errores más bajos se encontraron trabajando a 70 eV. Atendiendo a todo lo anterior y a algunos de los trabajos consultados (9, 12), finalmente se seleccionó una energía de ionización de 70 eV al ser la que ofrecía relaciones isotópicas más exactas y precisas en los análisis simultáneos de las especies de mercurio y estaño.

2.2.4.2 Tiempo de integración (*dwell time*)

El tiempo de integración o *dwell time* representa el tiempo que el detector está monitorizando cada una de las masas seleccionadas en el modo SIM. Este parámetro puede afectar en los espectros de masas obtenidos según lo recogido en uno de los trabajos consultados en el que se analizan los compuestos butilados de estaño por GC-MS (9). En dicho trabajo se comprobó que los tiempos de integración menores (10 ms en su caso) eran los más convenientes para evitar la aparición de asimetrías espectrales de los diferentes isótopos del estaño a la hora de medir las relaciones isotópicas. Atendiendo a lo anterior, en nuestro trabajo, se empezó utilizando el tiempo de integración menor permitido por el equipo que era de 30 ms.

No obstante, para mejorar los resultados obtenidos tras fijar la energía de ionización en 70 eV, se procedió a evaluar el efecto del tiempo de integración en un intervalo comprendido entre 30 y 80 ms calculando el error cometido en las relaciones isotópicas medidas respecto a las teóricas en patrones con las especies de mercurio y estaño objeto de nuestro estudio. En el caso del estaño, no se observó una tendencia muy marcada aunque, en general, los valores que ofrecieron mejores resultados fueron 50, 60 y 80 ms por masa (*tabla 5.5*), a diferencia de lo encontrado por otros autores (9), donde las relaciones isotópicas se medían mejor trabajando a tiempos de integración menores.

Tabla 5.5. Efecto del tiempo de integración en los porcentajes de error de las relaciones isotópicas calculados respecto a las relaciones teóricas para los compuestos butilados de estaño ($n=3$)

Tiempo integración (ms)	MBT		DBT		TBT	
	120/119	118/119	120/119	118/119	120/119	118/119
30	2,300	1,151	1,271	0,233	0,955	0,902
40	1,350	0,406	1,219	0,906	0,454	1,328
50	0,929	0,193	0,876	0,122	0,243	1,434
60	0,744	0,370	1,535	0,122	0,428	0,796
70	1,350	1,080	0,586	0,619	0,401	0,760
80	0,480	0,339	1,034	0,158	0,337	0,973

Por otro lado, en lo que respecta al mercurio, los tiempos de integración que permitían el cálculo más preciso de las relaciones isotópicas fueron 40 y 60 ms por masa (tabla 5.6).

Tabla 5.6. Efecto del tiempo de integración en los porcentajes de error de las relaciones isotópicas calculados respecto a las relaciones teóricas para las especies de mercurio ($n=3$)

Tiempo integración (ms)	CH ₃ Hg ⁺			Hg ²⁺		
	199/202	200/202	201/202	199/202	200/202	201/202
30	1,343	0,670	2,759	0,848	0,960	0,059
40	1,527	0,627	1,853	0,411	0,462	0,128
50	2,339	0,588	2,264	1,164	1,047	0,369
60	1,232	0,057	1,760	0,928	0,841	0,938
70	2,090	0,426	2,094	1,460	0,893	0,544
80	2,130	1,370	2,183	0,413	0,177	1,001

Para estudiar la reproducibilidad de estas medidas se hicieron seis replicados independientes de los tiempos de integración que ofrecieron mejores resultados en los experimentos previos que aparecen sombreados en las *tablas 5.5 y 5.6*. Los errores de las relaciones isotópicas medidas respecto a las relaciones isotópicas teóricas obtenidos a los diferentes tiempos de integración estudiados para la relación isotópica $^{120}\text{Sn}/^{119}\text{Sn}$ en el caso de los compuestos butilados de estaño y la $^{201}\text{Hg}/^{202}\text{Hg}$ para el monometilmercurio aparecen representados en la *figura 5.4*. Como puede observarse en dicha figura y teniendo en cuenta las incertidumbres de los valores para 50, 60 y 80 ms (que aparecen expresadas como la desviación estándar (*s*) de 6 medidas independientes), no existen diferencias significativas entre los errores obtenidos a los diferentes tiempos de integración, ya que en todos los casos fueron menores al 2,5 % para los compuestos estánicos y menores al 3,0 % para las especies de mercurio. Sin embargo, el valor de 60 ms es el que permite obtener una menor desviación respecto a las relaciones isotópicas teóricas especialmente para TBT y CH_3Hg^+ .

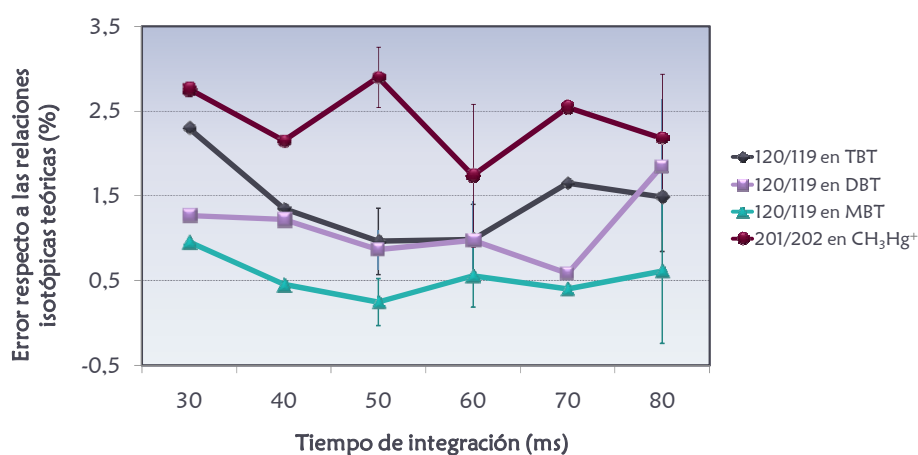


Figura 5.4. Porcentaje de error obtenido en el cálculo de las relaciones isotópicas respecto a las teóricas en la medida de las relaciones $^{120}\text{Sn}/^{119}\text{Sn}$ para MBT, DBT y TBT y $^{201}\text{Hg}/^{202}\text{Hg}$ para CH_3Hg^+ a diferentes tiempos de integración

2.2.5 CONDICIONES INSTRUMENTALES SELECCIONADAS

Las condiciones instrumentales del sistema GC-MS utilizado que se consideraron óptimas para lograr una adecuada medida de las relaciones isotópicas de Sn y Hg se resumen en la *tabla 5.7*.

Tabla 5.7. *Parámetros óptimos para el acoplamiento GC-MS*

Cromatógrafo de gases	HP-5890
Columna	DB-5, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m
Gas portador	He (1 mL min ⁻¹)
Modo de inyección	Splitless
Tiempo de purga	1 minuto
Temperatura de inyección	250 °C
Programa de temperaturas	40 °C (1 min.) a 15 °C min ⁻¹ hasta 90 °C 90 °C a 30 °C min ⁻¹ hasta 280 °C (4 min.)
Características del detector	JMS-Q1000GC
Corriente de ionización	300 μ A
Energía de ionización	70 eV
Temperatura de la fuente	250 °C
Temperatura de la interfase	280 °C
Tiempo de integración	60 ms

Trabajando a un tiempo de integración de 60 ms y una energía de ionización de 70 eV, se obtuvieron las relaciones isotópicas y los errores respecto a las teóricas que se indican en la *tabla 5.8*. Además, bajo esas condiciones la reproducibilidad de las medidas de las relaciones isotópicas de Sn y Hg en estándares con abundancias naturales fue menor del 0,5 % para todos los casos.

Tabla 5.8. Relaciones isotópicas obtenidas y errores respecto a las teóricas para los compuestos de estaño y mercurio trabajando en las condiciones seleccionadas

	Relación isotópica	Valor teórico	Valor medido \pm SD	Error \pm SD (%)
MBT	$^{120}\text{Sn}/^{119}\text{Sn}$	3,793	$3,812\pm 0,017$	$0,6\pm 0,5$
DBT	$^{120}\text{Sn}/^{119}\text{Sn}$	3,793	$3,830\pm 0,018$	$1,0\pm 0,5$
TBT	$^{120}\text{Sn}/^{119}\text{Sn}$	3,793	$3,826\pm 0,025$	$1,0\pm 0,4$
CH_3Hg^+	$^{201}\text{Hg}/^{202}\text{Hg}$	0,441	$0,449\pm 0,004$	$1,7\pm 0,8$
Hg^{2+}	$^{201}\text{Hg}/^{202}\text{Hg}$	0,441	$0,444\pm 0,002$	$0,6\pm 0,4$

3.- METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS POR GC-MS

Una vez optimizados los parámetros del sistema GC-MS que se va a utilizar en las determinaciones de los compuestos organometálicos de estaño y mercurio fue necesario incidir en la etapa de pretratamiento de los diferentes tipos de muestras medioambientales (aguas, sedimentos y muestras biológicas) que se pretenden analizar. Para ello se aplicó una metodología muy variada en función del tipo de muestra y del compuesto o compuestos a analizar en cada caso, que será posteriormente descrita. Dicha metodología fue desarrollada y, posteriormente, validada utilizando diversos materiales de referencia con contenidos certificados para las especies de mercurio y/o los compuestos butilados de estaño cuyas características se resumen en la *tabla 5.9*. Para el monometilmercurio se utilizó el material de referencia biológico BCR-464, mientras que para la determinación independiente de los compuestos de estaño se utilizaron los materiales CRM-477 y SOPH-1, que se corresponden con un material biológico y un sedimento de referencia, respectivamente. Por otro lado, la determinación simultánea se validó con el BCR-710 certificado para CH_3Hg^+ y TBT.

Tabla 5.9. Materiales de referencia certificados utilizados para el desarrollo y validación del método de determinación de especies de Hg y Sn

Material de referencia	Tipo de material	Compuestos con valores certificados	Organismo certificador
BCR-464	Músculo de atún	CH ₃ Hg ⁺	Institute for Reference Materials and Measurements (Bélgica)
CRM-477	Tejido de mejillón	MBT, DBT, TBT	Institute for Reference Materials and Measurements (Bélgica)
SOPH-1	Sedimento de mar	DBT, TBT	National Research Council of Canada
BCR-710	Tejido de ostra	CH ₃ Hg ⁺ , TBT	Institute for Reference Materials and Measurements (Bélgica)

3.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA SU ANÁLISIS POR GC-MS

En este trabajo los análisis se realizaron por dilución isotópica específica, por lo que, en todos los casos, la primera etapa de la preparación de la muestra, consistió en la adición de las especies enriquecidas isotópicamente. De esta manera, al realizar la suplementación al comienzo del proceso analítico va a ser posible poder corregir cualquier fuente de error que pueda producirse a lo largo de todo el proceso. A continuación, en el caso de matrices sólidas, fue necesario realizar una extracción cuantitativa de las especies y, seguidamente, se procedió a la derivatización de los extractos obtenidos. Además, en función del tipo de muestra, en algunos casos hubo que recurrir a procedimientos adicionales de limpieza y/o preconcentración como el uso de Florisil, la microextracción en fase sólida (SPME) o la evaporación por medio de una corriente de nitrógeno.

3.1.1 ADICIÓN DE LAS ESPECIES ENRIQUECIDAS ISOTÓPICAMENTE

Tras estudiar la medida de las distintas relaciones isotópicas de Sn y Hg se decidió suplementar las muestras adicionando estándares enriquecidos isotópicamente en ^{119}Sn y ^{201}Hg , de ahí que las relaciones isotópicas estudiadas fueron la $^{120}\text{Sn}/^{119}\text{Sn}$ y $^{201}\text{Hg}/^{202}\text{Hg}$ para estaño y mercurio, respectivamente.

En el caso de los compuestos butilados de estaño (MBT, DBT y TBT), la adición se realizó utilizando una mezcla que contenía los tres compuestos enriquecidos en ^{119}Sn que fue suministrada por ISC-Science (Gijón, España). No obstante, la mezcla comercial fue diluida con una mezcla de ácido acético y metanol (3:1) y conservada en la oscuridad a -18°C hasta su empleo. Por su parte, el monometilmercurio enriquecido en ^{201}Hg empleado, fue sintetizado tal y como fue descrito en un trabajo previo (13), es decir, a partir de óxido de mercurio enriquecido en ^{201}Hg (^{201}HgO) usando metilcobalamina. Estas disoluciones con las especies enriquecidas isotópicamente se añadieron a las muestras antes de proceder a la extracción y derivatización, debido a que se pretendía realizar un análisis por dilución isotópica específica. La cantidad a añadir de las especies enriquecidas isotópicamente fue seleccionada teniendo en consideración la teoría de propagación de errores aleatorios (14). Así pues, se añadieron sólo unos pocos microlitros de disolución trazadora a la muestra inicial. El volumen exacto fue controlado gravimétricamente y dependió de la cantidad de muestra pesada inicialmente.

3.1.2 EXTRACCIÓN DE LAS ESPECIES ORGANOMETÁLICAS

La extracción de las especies de estaño y mercurio desde las matrices sólidas se llevó a cabo utilizando un sistema de extracción por microondas focalizado suministrado por CEM Corporation (Mathews, NC, USA). Debido a las posibilidades instrumentales de este sistema, se pudo realizar un control exhaustivo de la temperatura y la presión en el interior del vial, pudiendo monitorizar dichas variables a lo largo de todo el proceso de extracción. Atendiendo a la bibliografía (15, 16), se seleccionaron dos agentes

extractantes diferentes para llevar a cabo la extracción de estas especies. Así, en el caso de la determinación individual de los compuestos butilados de estaño se utilizó una mezcla de ácido acético y metanol (3:1), mientras que para la determinación individual del monometilmercurio y las determinaciones simultáneas de las especies de mercurio y estaño se utilizó una disolución de hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) al 25 % m/v.

La cantidad de muestra a extraer fue seleccionada en función de experimentos previos realizados con el sistema de extracción (17). Así, las cantidades óptimas fueron de 0,1 g en el caso de las muestras biológicas y 0,05 g de los sedimentos. Estas cantidades se pesaron directamente sobre el vial de vidrio de 10 mL donde se iba a llevar a cabo la extracción. Asimismo las especies enriquecidas isotópicamente fueron adicionadas en ese mismo vial. Por último, se añadieron 4 mL del agente extractante correspondiente y las mezclas obtenidas fueron sometidas a la radiación microondas.

El programa de tiempos y temperaturas aplicado fue seleccionado en base a otros experimentos realizados con el mismo sistema de extracción por microondas focalizado (17) y consistió en la irradiación de las muestras a 70 °C durante 4 minutos, tras una rampa de 1 minuto para alcanzar la temperatura máxima.

3.1.3 DERIVATIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Los estudios preliminares realizados para la medida de las relaciones isotópicas con el sistema GC-MS indicaron que era más adecuado realizar la derivatización de las muestras con tetraetilborato de sodio. Así pues, los extractos fueron etilados en viales de vidrio de 15 mL en los que previamente se había adicionado 4 mL de tampón ácido acético/acetato de sodio 0,1 M. A continuación se ajustó el pH con ácido clorhídrico o amoníaco concentrados hasta alcanzar un pH de 5, ya que investigaciones previas para la derivatización simultánea de mercurio y estaño demostraron que dicho valor de pH era el óptimo (2). Una vez ajustado el pH, los extractos fueron

derivatizados de diferente manera en función del tipo de matriz y del analito a determinar.

Atendiendo a la bibliografía (18-20), en el caso de los análisis de los compuestos butilados de estaño en los materiales de referencia CRM-477 y SOPH-1 o la determinación simultánea de TBT y CH_3Hg^+ en el BCR-710, la derivatización se completó con una etapa de limpieza para minimizar las interferencias de la matriz en el posterior análisis del TBT. Así, se tomó inicialmente 0,5 mL de extracto a los que se añadieron 1 mL de hexano y 0,5 mL de NaBEt_4 (2,5 %) al vial donde se estaba realizando la derivatización y la mezcla se agitó durante 4 minutos. Tras la separación de las fases, la fase orgánica se limpió utilizando columnas de Florisil, tal y como se había descrito en uno de los trabajos consultados (18). Para ello se utilizaron columnas preparadas con 3 g de Florisil, eluyéndose los compuestos derivatizados retenidos en ellas con una mezcla de hexano/tolueno (1:1). Tras la limpieza, la fase orgánica resultante se transfirió a un vial cromatográfico de 2 mL y se conservó a $-18\text{ }^\circ\text{C}$. No obstante, antes del análisis la muestra fue preconcentrada aplicando una corriente de nitrógeno hasta conseguir un volumen de unos pocos microlitros para lograr así un factor de preconcentración de aproximadamente 15-20 veces.

Sin embargo, en el caso del análisis de monometilmercurio en el material biológico BCR-464, la derivatización se combinó con una etapa de preconcentración por microextracción en fase sólida (SPME) para conseguir que el pico del monometilmercurio quedara libre de las interferencias espectrales o el ruido de fondo que podían suponer la compleja matriz del material de referencia utilizado, conforme a lo publicado en otros trabajos (12, 21). En este caso, para la derivatización se tomó 1 mL de extracto y, una vez ajustado el pH, se realizó la microextracción en fase sólida utilizando un dispositivo de extracción manual que consistía en una cavidad con una fibra reemplazable de divinilbenceno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS). Atendiendo a las recomendaciones del fabricante, las fibras fueron acondicionadas antes de su empleo calentándolas en el bloque de inyección del cromatógrafo de gases a $270\text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 hora. Así, se añadió 1 mL de

NaBEt₄ (2,5 %) y se cerró el vial inmediatamente con un tapón de goma y silicio recubierto de politetrafluoretileno (PTFE). A continuación, el tapón fue atravesado por la aguja de SPME y la fibra se expuso a la disolución por espacio en cabeza a temperatura ambiente durante 15 minutos mientras que era vigorosamente agitada por un agitador magnético recubierto de PTFE a una velocidad constante. Por último, las fibras fueron retiradas de la aguja y transferidas al inyector del cromatógrafo de gases por desorción térmica durante 1 minuto a 250 °C.

3.1.4 ANÁLISIS DE MUESTRAS DE AGUA

En el caso del análisis de muestras de agua, no fue necesaria la etapa de extracción. Así, se tomaron 50 mL de las aguas en un frasco de vidrio, se pesaron y se adicionaron las especies organometálicas enriquecidas isotópicamente que habían sido corregidas gravimétricamente usando balances analíticos y según la teoría de propagación de errores (14). Los frascos se cerraron con un tapón de goma y silicio recubierto de PTFE, se agitaron vigorosamente durante 1 minuto y finalmente se dejaron en reposo un tiempo de 15 minutos para la equilibración isotópica, como se describe en la bibliografía (22). A continuación, se retiró el tapón y se añadieron 5 mL de tampón ácido acético-acetato de sodio 0,1 M, 200 µL de NaBEt₄ (2,5 %) y 1 mL de hexano para llevar a cabo la etilación. Tras agitar durante 5 minutos, la fase orgánica fue transferida a un vial de 2 mL, conservada a -18 °C y preconcentrada unas diez veces llevando a unos pocos microlitros mediante una corriente de nitrógeno justo antes del análisis.

Los procedimientos descritos anteriormente para la preparación de los diferentes tipos de muestras para el posterior análisis de las especies organomercuriales u organoestánicas por ID-GC-MS se resumen esquemáticamente en la *figura 5.5*.

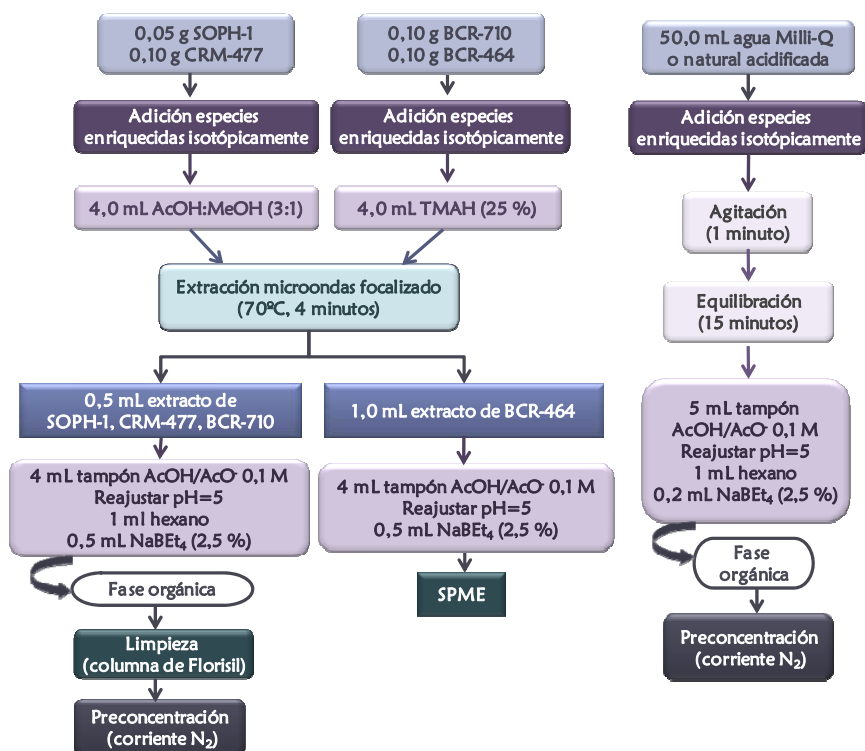


Figura 5.5. Protocolos de preparación de la muestra utilizados en este trabajo

3.2 VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA DESARROLLADA

La metodología que se ha expuesto anteriormente fue validada, en primer lugar, mediante la determinación independiente de las especies de mercurio y estaño utilizando materiales de referencia certificados sólo para los compuestos organomercurícos u organoestánnicos. Finalmente, el método de determinación simultánea desarrollado se validó mediante el análisis de un agua natural fortificada con diferentes niveles de concentración de las especies estudiadas. Asimismo, fue validado utilizando el material de referencia BCR-710 en el que se conocen los contenidos certificados para monometilmercurio y tributilestaño y unos valores propuestos para mono- y di- butilestaño.

3.2.1 DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE MERCURIO O ESTAÑO

En primer lugar, la metodología desarrollada fue aplicada al análisis de diferentes materiales de referencia certificados para especies de estaño o mercurio que fueron tratados tal y como se ha indicado en el apartado anterior. Los resultados obtenidos de los análisis de dichos materiales así como los correspondientes valores certificados se muestran en la *tabla 5.10*.

Tabla 5.10. Concentraciones de MBT, DBT, TBT y CH_3Hg^+ (como ng g^{-1} de Hg o Sn) obtenidas en el análisis de materiales de referencia certificados

	CH_3Hg^+	MBT	DBT	TBT
BCR-464				
Valor encontrado	4967 ± 106	---	---	---
Valor certificado	5117 ± 160	---	---	---
CRM-477				
Valor encontrado	---	1030 ± 9	792 ± 6	841 ± 9
Valor certificado	---	1013 ± 189	785 ± 61	900 ± 78
SOPH-1				
Valor encontrado	---	---	176 ± 6	122 ± 4
Valor certificado	---	---	174 ± 9	125 ± 7

(Incertidumbres expresadas como la desviación estándar para 3 medidas independientes)

Los resultados no presentan diferencias estadísticamente significativas con los valores certificados al nivel de significación escogido ($p=0,05$) y, además, en todos los casos se obtuvieron reproducibilidades muy buenas en los análisis de los distintos replicados. Asimismo se comprueba que la reducción en la cantidad de muestra sometida a la extracción (0,1 g para los materiales biológicos y 0,05 g para los sedimentos), que permite la geometría tan estrecha de los viales que pueden ser dispuestos en el microondas, no afecta a la homogeneidad de los materiales como se demuestra por la reproducibilidad y exactitud de los resultados obtenidos.

Por último, cabe destacar que los procedimientos de limpieza y/o preconcentración utilizados, esto es, SPME para el análisis de monometilmercurio en el tejido de atún y columnas de Florisil para la determinación de los compuestos butilados de estaño, ofrecieron buenos resultados, permitiendo eliminar ciertas interferencias provocadas por la matriz así como mejorar la sensibilidad del método.

3.2.2 DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE DIFERENTES ESPECIES DE MERCURIO Y ESTAÑO

El método propuesto para la determinación multielemental simultánea de especies de estaño y mercurio por dilución isotópica específica fue validado, en primer lugar, mediante el análisis de dos muestras de agua fortificadas, agua Milli-Q y un agua natural procedente de la comarca de Almadén. El agua natural fue tomada en el embalse de La Serena en septiembre de 2005 y presenta unos valores de pH y conductividad medidos *in situ* de 7,9 y 290 mS cm⁻¹, respectivamente. Esta muestra de agua fue previamente analizada en cuanto a su contenido de monometilmercurio y se comprobó que estaba por debajo de los límites de detección. Así pues, las dos muestras de agua fueron fortificadas adicionando las cuatro especies de mercurio y estaño estudiadas en sus abundancias isotópicas naturales en dos niveles diferentes de concentración (5 y 10 ng L⁻¹).

Como se puede observar en la *tabla 5.11*, se obtuvieron recuperaciones próximas al 100 % para todas las concentraciones y todas las especies con una buena reproducibilidad entre los tres replicados independientes realizados. Además, el análisis de tres blancos de agua Milli-Q permitió estimar los límites de detección del método para las cuatro especies que aparecen reflejados en la *tabla 5.11*. Los valores obtenidos demuestran que la metodología desarrollada para el análisis por GC-MS puede ser considerada como una buena alternativa al empleo del acoplamiento instrumental GC-ICP-MS, que es una técnica más sofisticada, cara y con una menor disponibilidad en un laboratorio de rutina. Esta mejora en la

sensibilidad del GC-MS se debe a que la incorporación de la etapa de preconcentración hace posible alcanzar límites de detección comparables en ambas técnicas, siendo los valores de los blancos el único factor limitante. De esta manera, los límites de detección obtenidos para los tres compuestos butilados de estaño fueron muy próximos a los hallados previamente en otros trabajos realizados con GC-MS (23) y con GC-ICP-MS (2, 22). Sin embargo, los límites de detección para el monometilmercurio fueron cinco veces mayores que los obtenidos para las especies de estaño y superiores también a los encontrados en trabajos realizados aplicando el mismo procedimiento de preparación de la muestra pero utilizando como técnica de análisis GC-ICP-MS (2).

Tabla 5.11. Límites de detección y recuperaciones obtenidas en las aguas fortificadas con 5 ó 10 ng L⁻¹ (como Hg o Sn) para CH₃Hg⁺, MBT, DBT y TBT

	CH ₃ Hg ⁺	MBT	DBT	TBT
Límites de detección				
(ng L ⁻¹ como Sn o Hg)	0,63	0,15	0,12	0,14
% R en agua Milli-Q				
5 ng L ⁻¹ (como Sn o Hg)	96±3	99±6	98±6	95±4
10 ng L ⁻¹ (como Sn o Hg)	102±4	97±2	101±4	101±11
% R en agua natural				
5 ng L ⁻¹ (como Sn o Hg)	98±1	101±2	103±2	99±1
10 ng L ⁻¹ (como Sn o Hg)	98±3	99±1	103±1	101±1

(Incertidumbres expresadas como la desviación estándar para 3 medidas independientes)

Todo ello indica que la sensibilidad es muy diferente para cada uno de los elementos estudiados lo cual se refleja también en la *figura 5.6* donde se representa un cromatograma obtenido con el sistema GC-MS correspondiente a un agua natural fortificada con una concentración de 10 ng L⁻¹ de las cuatro especies organometálicas.

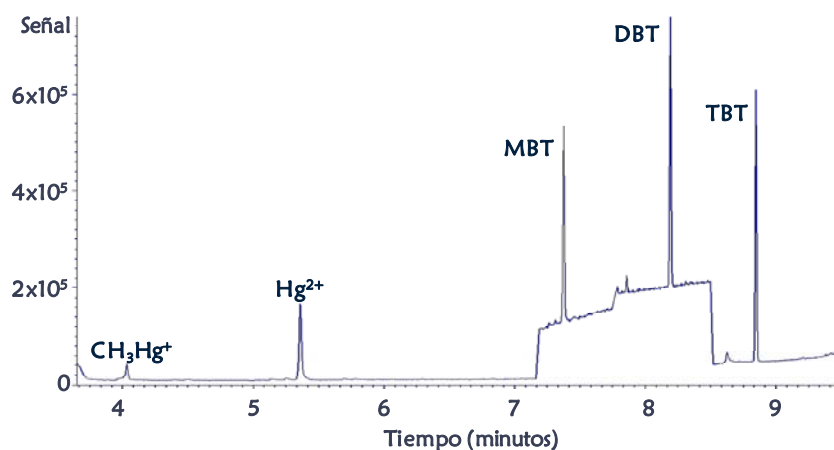


Figura 5.6. Cromatograma de un agua natural fortificada con una concentración de 10 ng L^{-1} de las especies de mercurio y estaño

Por último, la metodología desarrollada fue validada mediante el análisis del material de referencia BCR-710, en el que los contenidos de CH_3Hg^+ y TBT se encuentran certificados y las concentraciones de MBT y DBT aparecen indicadas mediante unos valores propuestos. Los resultados obtenidos (*tabla 5.12*) muestran que se obtuvieron valores que no presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto a los valores certificados o propuestos en cada uno de los casos para un nivel de significación seleccionado ($p=0,05$).

Tabla 5.12. Concentraciones de MBT, DBT, TBT y CH_3Hg^+ obtenidas en el análisis del material de referencia BCR-710 (expresadas como ng g^{-1} de Hg o Sn)

BCR 710	CH_3Hg^+	MBT	DBT	TBT
Valor encontrado	109 ± 4	34 ± 6	49 ± 2	53 ± 3
Valor certificado	107 ± 17	---	---	54 ± 7
Valor propuesto	---	34 ± 9	42 ± 9	---

(Incertidumbres expresadas como la desviación estándar para 3 medidas independientes)

4.- CONCLUSIONES

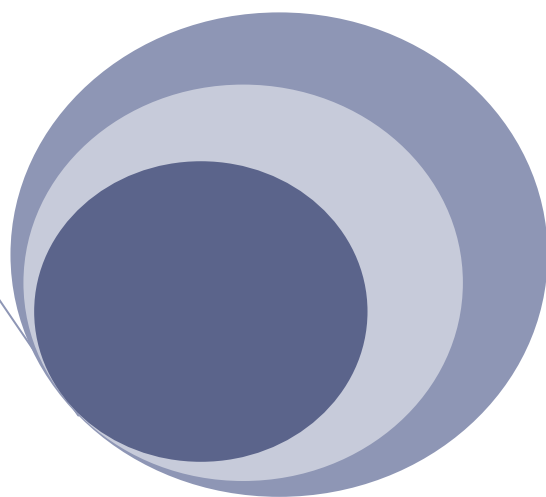
En este capítulo se ha desarrollado una metodología para la determinación de especies organomercúricas y organoestánnicas por GC-MS que presenta ciertas ventajas en comparación con los métodos que habían sido previamente descritos. Por un lado, permite la determinación simultánea de diferentes especies de elementos distintos (CH_3Hg^+ , MBT, DBT y TBT) en muestras medioambientales usando un procedimiento común para la preparación de la muestra. Además, el hecho de que la metodología se base en el análisis por dilución isotópica específica permite conseguir una mayor exactitud y precisión en los resultados comparando con otras técnicas de calibración externas o de adiciones estándar. Todo ello, hace que se reduzca considerablemente el tiempo total de análisis. Asimismo, el uso de un acoplamiento instrumental tan extendido como es el GC-MS con una fuente de ionización por impacto electrónico abre el campo de aplicación de la metodología desarrollada a los laboratorios de rutina donde habría dificultades para utilizar otros sistemas acoplados como el GC-ICP-MS.

5.- BIBLIOGRAFÍA

1. Monperrus, M., Rodríguez Martín-Doimeadios, R.C., Scancar, J., Amouroux, D., Donard, O.F.X. Simultaneous sample preparation and species-specific isotope dilution mass spectrometry analysis of monomethylmercury and tributyltin in a certified oyster tissue. *Analytical Chemistry*. 2003, Vol. 75, p. 4095-4102.
2. Monperrus, M., Tessier, E., Veschambre, S., Amouroux, D., Donard, O.F.X. Simultaneous speciation of mercury and butyltin compounds in natural waters and snow by propylation and species-specific isotope dilution mass spectrometry analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2005, Vol. 381, p. 854-862.
3. Poperechna, N., Heumann, K.G. Simultaneous multi-species determination of trimethyllead, monomethylmercury and three butyltin compounds by species-specific isotope dilution. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2005, Vol. 383, p. 153-159.
4. Monperrus, M., Krupp, E., Amouroux, D., Donard, O.F.X., Rodríguez Martín-Doimeadios, R.C. Potential and limits of speciated isotope-dilution analysis for metrology and assessing environmental reactivity. *Trends in Analytical Chemistry*. 2004, Vol. 23, p. 261-272.
5. Heumann, K.G. Isotope dilution ICP-MS for trace element determination and speciation: from a reference method to a routine method? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2004, Vol. 378, p. 318-329.
6. Rodríguez-González, P., Marchante-Gayón, J.M., García Alonso, J.I., Sanz-Medel, A. Isotope dilution analysis for elemental speciation: A tutorial review. *Spectrochimica Acta Part B*. 2005, Vol. 60, p. 151-207.
7. Centineo, G., Rodríguez-González, P. Determinación de mono-, di- y tributilestaño en aguas mediante dilución isotópica GC-MS. *Innovative Solutions in Chemistry S.L.* http://www.isc-science.com/docs/Procedimientos_MDT119.pdf. 2006.
8. Heumann, K.G. Elemental species analyses with isotope dilution mass spectrometry. J.A.C., Gücer, S., Adams, F. Broekaert, Eds. *Metal speciation in the environment, NATO ASI Series*. Berlin: Ed. Springer-Verlag, 1990, Vol. G23, p. 153-168.
9. Centineo, G., Rodríguez-González, P., Blanco González, E., García Alonso, J.I., Sanz-Medel, A. Simultaneous determination of mono-, di- and tributyltin in environmental samples using isotope dilution gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 2004, Vol. 39, p. 485-494.

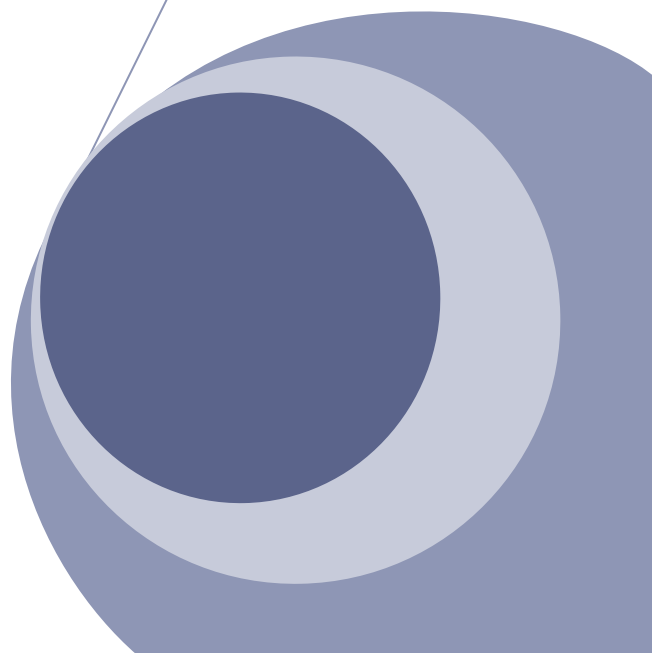
10. **Bancon-Montigny, C., Maxwell, P., Yang, L., Mester, Z., Sturgeon, R.E.** Improvement of measurement precision of SPME-GC-MS determination of tributyltin using isotope dilution calibration. *Analytical Chemistry*. 2002, Vol. 74, p. 5606-5613.
11. **Meija, J., Caruso, J.A.** Deconvolution of isobaric interferences in mass spectra. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2004, Vol. 15, p. 654-658.
12. **Centineo, G., Blanco González, E., García Alonso, J.I., Sanz-Medel, A.** Isotope dilution SPME GC/MS for the determination of methylmercury in tuna fish samples. *Journal of Mass Spectrometry*. 2006, Vol. 41, p. 77-83.
13. **Rodríguez Martín-Doimeadios, R.C., Stoichev, T., Krupp, E., Amouroux, D., Holeman, M., Donard, O.F.X.** Micro-scale preparation and characterization of isotopically enriched monomethylmercury. *Applied Organometallic Chemistry*. 2002, Vol. 16, p. 610-615.
14. **García Alonso, J.I.** Determination of fission products and actinides by inductively coupled plasma-mass spectrometry using isotope dilution analysis: a study of random and systematic errors. *Analytica Chimica Acta*. 1995, Vol. 312, p. 57-78.
15. **Rodríguez-González, P., García Alonso, J.I., Sanz-Medel, A.** Development of a triple spike methodology for validation of butyltin compounds speciation analysis by isotope dilution mass spectrometry. Part 2: Study of different extraction procedures for the determination of butyltin compounds in mussel tissue CRM 477. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2004, Vol. 19, p. 767-772.
16. **Tseng, C.M., de Diego, A., Martín, F.M., Amouroux, D., Donard, O.F.X.** Rapid determination of inorganic mercury and methylmercury in reference biological samples by hydride generation, cryofocussing atomic absorption spectrometry after open-focused microwave field alkaline digestion. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 1997, Vol. 12, p. 743-750.
17. **Pacheco, J., Rodríguez-González, P., Valiente, M., Donard, O.F.X., Barclay, D., Collins, M.** Application of focused microwave technology in combination with species-specific isotope dilution analysis for the accurate determination of organometallic contaminants in solid environmental matrices (*in preparation*).
18. **Ceulemans, M., Witte, C., Lobinski, R., Adams, F.C.** Simplified sample preparation for GC speciation analysis of organotin in marine biomaterials. *Applied Organometallic Chemistry*. 1994, Vol. 8, p. 451-461.

19. **De la Calle-Gutiñas, M.B., Scerbo, R., Chiavarini, S., Quevauviller, Ph., Morabito, R.** Comparison of derivatization methods for the determination of butyl- and phenyl-tin compounds in mussels by gas chromatography. *Applied Organometallic Chemistry*. 1997, Vol. 11, p. 639-702.
20. **Pellegrino, C., Massaniso, P., Morabito, R.** Comparison of twelve selected extraction methods for the determination of butyl- and phenyltin compounds in mussel samples. *Trends in Analytical Chemistry*. 2000, Vol. 19, p. 97-106.
21. **Yang, L., Colombini, V., Maxwell, P., Mester, Z., Sturgeon, R.E.** Application of isotope dilution to the determination of methylmercury in fish tissue by solid-phase microextraction gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2003, Vol. 1011, p. 135-142.
22. **Rodríguez-González, P., Ruiz Encinar, J., García Alonso, J.I., Sanz-Medel, A.** Determination of butyltin compounds in coastal seawater samples using isotope dilution GC-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2002, Vol. 17, p. 824-830.
23. **Centineo, G., Rodríguez-González, P., Blanco González, E., García Alonso, J.I., Sanz-Medel, A., Font Cardona, N., Aranda Mates, J.L., Ballester Nebot, S.** Isotope dilution GC-MS routine method for the determination of butyltin compounds in water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2006, Vol. 384, p. 908-914.



Capítulo VI

Especiación de mercurio en la Comarca de Almadén



1.- LA COMARCA DE ALMADÉN

1.1 DESCRIPCIÓN GENERAL

La Comarca de Almadén se encuentra situada en la zona sudoeste de la provincia de Ciudad Real (España) a 100 km de la capital, limitando con las provincias de Córdoba al Sur y Badajoz al Oeste (*figura 6.1*).

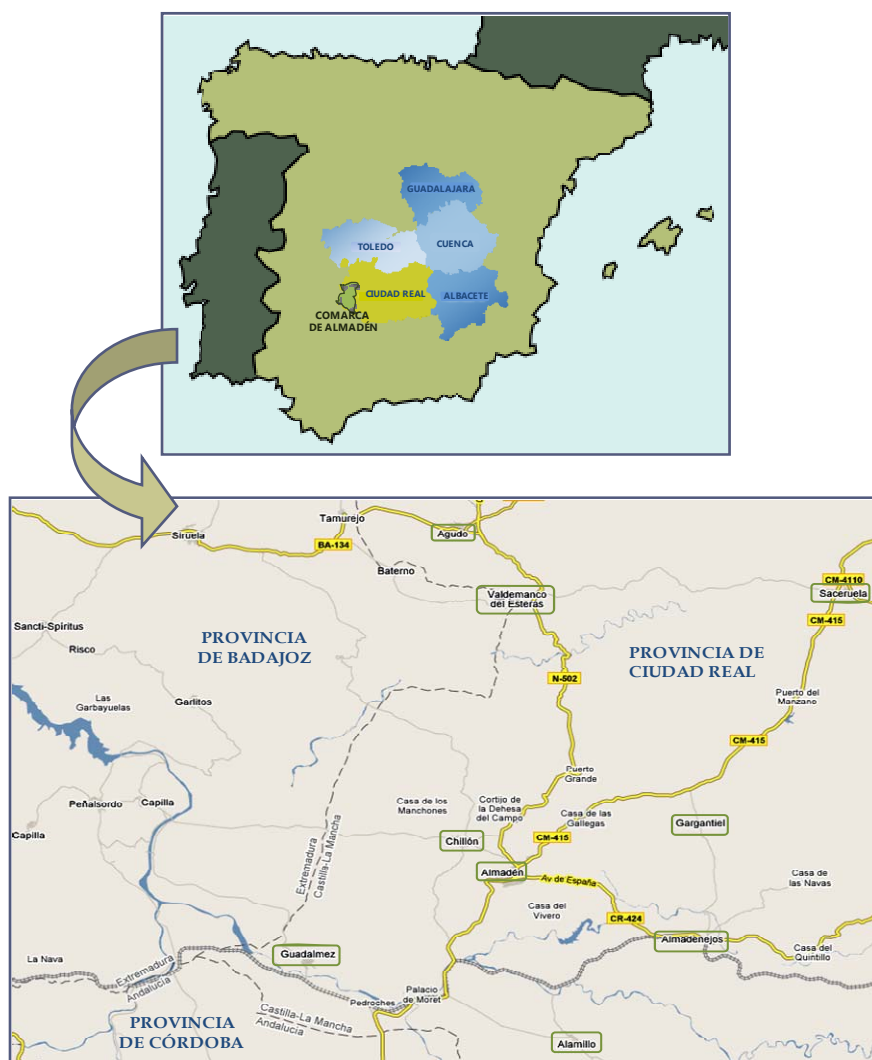


Figura 6.1. Localización geográfica de la Comarca de Almadén

Incluye los municipios de Agudo, Alamillo, Almadén, Almadenejos, Chillón, Guadalmez, Saceruela y Valdemanco del Esteras (1). La zona se caracteriza por su escasa densidad de población (menos de 25 habitantes km⁻²) y el pequeño tamaño de las poblaciones.

La Comarca de Almadén es conocida a escala mundial por los yacimientos de cinabrio que se encuentran en la zona y que constituyen la explotación de mercurio más antigua y de mayor producción. Estos yacimientos, que se formaron a partir de exhalaciones volcánicas submarinas hace más de 350 millones de años, han estado cerca de la superficie y en contacto directo con los niveles acuíferos superficiales durante los últimos 250 millones de años (2). La mayor parte de la mineralización se presenta como sulfuro de mercurio (cinabrio), aunque también hay un porcentaje muy significativo (5-10 %) que aparece como mercurio metálico, en gotitas distribuidas por la porosidad de la roca. Se estima que Almadén ha producido aproximadamente la tercera parte del mercurio consumido por la humanidad, habiéndose extraído de sus minas unos nueve millones de frascos (un frasco de mercurio contiene 34,5 kg de metal) (3). Esta cantidad es aproximadamente dos veces y media superior a la producida en la segunda mina del mundo (Idria en Eslovenia) y casi cuatro veces superior a la tercera (Monte Amiata en Italia).

La actividad minera de Almadén cesó en mayo de 2002 debido principalmente a la caída del precio del mercurio en el mercado mundial debido a la reducción de su uso por su elevada toxicidad. Sin embargo, la extracción de mercurio continuó hasta febrero de 2004 sobre el mineral que había sido previamente acumulado (4, 5). En principio, se puede considerar que este cierre es definitivo aunque, en un futuro, el precio y la demanda de mercurio podrían hacer que se reanudara la actividad en dicho distrito minero (5). En 2006 las puertas de la mina de Almadén fueron abiertas al público para poder visitarlas y poder disfrutar de la experiencia de bajar a 50 metros y ver cómo era la mina con el paso de los años y cómo fue explotada con las tecnologías de cada época.

Como consecuencia de la actividad de explotación y transformación llevada a cabo durante siglos, la contaminación actual de la zona se debe fundamentalmente a la deposición de mercurio atmosférico. No obstante, otra importante forma de transporte del mercurio generado la constituyen las corrientes de agua, es decir, ríos y arroyos, que pueden trasladar el mercurio en la fase disuelta y particulada a lo largo de cientos de kilómetros (6). En este sentido los ríos y arroyos de la Comarca de Almadén podrían desempeñar un papel importante. Entre ellos el más importante es el río Valdeazogues ya que es el único que está afectado directamente por las actividades mineras, que en algunos casos se encuentran situadas incluso en su propio cauce.

El río Valdeazogues pertenece a la Cuenca del Guadiana y se incluye dentro de los afluentes procedentes de Sierra Morena. Sigue la dirección de Este-Sureste a Oeste-Noroeste y, como todos los afluentes de la zona, tiene un bajo caudal y una gran irregularidad interanual, llegando a secarse en algunos puntos durante el período estival. Sobre este río se encuentran situadas dos presas: Castilseras (5,30 Hm³ de capacidad) y El Entredicho (5,37 Hm³), habiéndose construido esta última con el fin de evitar avenidas de aguas sobre unas explotaciones mineras. El río Valdeazogues es un afluente del río Guadalmez, que antes desembocaba en el río Zújar y que actualmente termina directamente en el embalse de La Serena. Este embalse fue inaugurado en febrero de 1990 y tiene especial interés debido a su gran capacidad (3.232 Hm³), ya que con sus 600 m de largo y 95 m de alto crea el mayor de todos los embalses de España y uno de los mayores de Europa tras los de Alqueva (Portugal) y Kremasta (Grecia). El embalse de La Serena, que se encuentra en Badajoz y ocupa terrenos en las provincias de Córdoba y Ciudad Real, tiene una superficie de agua embalsada de unas 14.000 Ha y una longitud de costas de 530 km. Funcionalmente, esta presa consigue la regulación del río Zújar, que es uno de los más irregulares de España.

Uno de los aspectos que puede resultar más sorprendente de la Comarca de Almadén es su situación medioambiental. A *priori*, podría pensarse que la Comarca que ha sido principal productora mundial de una

sustancia altamente contaminante y que ha soportado durante siglos la minería y metalurgia del mercurio, debería estar profundamente degradada. Sin embargo, aún no se ha constatado un impacto ambiental tan significativo como consecuencia de la minería del mercurio ya que, por ejemplo, la flora y fauna de la zona no se han visto alteradas por esta circunstancia. Así, la Comarca de Almadén, sin llegar a ser una “reserva natural”, preserva la flora y fauna autóctonas en un buen estado de conservación. La morfología y constitución del terreno, así como la sequedad del clima (tan sólo 600 mm m⁻² de precipitación anual como promedio) (2), hacen que el desarrollo del suelo y de la vegetación sea escaso, por lo que el área cuenta con suelos esqueléticos de bajo contenido en materia orgánica y con una vegetación de tipo mediterráneo. Sin embargo, la Comarca de Almadén es de una gran riqueza faunística ya que se puede encontrar tejones, ginetas, gato montés, etc. Además existe una importante actividad cinegética, tanto en el orden de la caza mayor como menor, que constituye uno de los principales recursos económicos de la zona. Por otro lado, en cuanto a las especies que se dan en los ríos, las más destacadas son black bass, barbos, bogas, carpas y cangrejos. Encontrándose también unas especies de bivalvos pertenecientes a la familia Unionidae, *Psilunio littoralis* y *Unio pictorum*. Por tanto, el hecho de que la cantidad de mercurio tan abundante existente en la zona no haya producido efectos evidentes sugiere que los mecanismos de generación de metilmercurio deben estar regidos por procesos de mayor complejidad que los conocidos hasta el momento por lo que, en este contexto, este distrito minero podría constituir un excelente análogo natural para la verificación de los ciclos naturales del mercurio.

1.2 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS RELATIVOS A LA CONTAMINACIÓN POR MERCURIO

La historia del mercurio y de la Comarca de Almadén han estado íntimamente ligadas desde la antigüedad. La existencia de las minas de mercurio ha influido en la realización de estudios relativos a la zona, aunque

entre ellos predominan los trabajos geológicos y geológico-mineros encaminados principalmente a encontrar las causas de esta acumulación monometálica (7-9). Por su parte, pese a la importancia que tiene conocer el comportamiento y distribución del mercurio en la Comarca de Almadén y sus implicaciones toxicológicas, hasta el momento se han realizado pocos estudios de contaminación en dicha zona. Además, cabe destacar que la mayoría de ellos se ha llevado a cabo en los últimos años, quizá debido a una mayor inquietud por las cuestiones medioambientales, aunque coincidiendo con el cese de la actividad de las minas.

Uno de los primeros estudios de la distribución de mercurio se llevó a cabo durante los años 1974-1977, fruto de una colaboración entre el Consejo de Minas de Almadén, la Dirección General de Sanidad, el *United States Environmental Protection Agency* (U.S.EPA) *Environmental Sciences Research Laboratory* y la *Environmental Science Division of the Oak Ridge National Laboratory* (ORNL). Los resultados obtenidos, que fueron publicados en 1980 en un informe interno (10), mostraron concentraciones de mercurio en plantas superiores a $100 \mu\text{g g}^{-1}$ y $1 \mu\text{g g}^{-1}$ en distancias de 0,5 y 20 km de la mina, respectivamente.

En 1979, Lindberg *et al.* (11) publicaron los resultados de un estudio de la distribución de mercurio en plantas que habían crecido en suelos recogidos cerca de la mina de Almadén, evaluándose asimismo la velocidad de volatilización del mercurio desde esos suelos en un experimento de laboratorio. En dicho estudio se encontraron concentraciones de mercurio en la superficie de los suelos comprendidas entre 0,5 y $260 \mu\text{g g}^{-1}$, correspondiendo los valores mayores a las zonas más cercanas a la mina de Almadén y observando una disminución a medida que nos alejamos de ella. Además, en 1983 apareció un artículo acerca de la distribución de mercurio en la vegetación de la Comarca de Almadén, evaluada durante una campaña posterior del ORNL (12).

Tras casi veinte años sin nuevos datos, Ferrara *et al.* (13) realizaron algunos estudios sobre la concentración de mercurio en el aire y los flujos

atmosféricos de mercurio desde las principales fuentes en los alrededores de Almadén. Para ello se llevaron a cabo dos campañas de muestreo entre 1993-1994. Los resultados indicaron altas concentraciones de mercurio ($0,1-5,0 \mu\text{g m}^{-3}$) sobre la población de Almadén en la dirección prevaleciente del viento (oeste y suroeste). Además el flujo total de mercurio en la atmósfera estimado fue de 600 a 1.200 g h^{-1} , por lo que incluso a una distancia considerable de la principal fuente de emisión (5-10 km) se observaron importantes concentraciones de mercurio en el aire ($0,05-0,10 \mu\text{g m}^{-3}$).

Entre los años 1995-1997, se evaluaron los niveles de contaminación por mercurio en el ambiente acuático de la zona, concretamente en el río Valdeazogues que discurre al lado de diversas explotaciones mineras (1). En este estudio se encontraron valores preocupantes de mercurio en los sedimentos, entre $5,5$ y $107 \mu\text{g g}^{-1}$ para la mayoría de los puntos, aunque se llegaron a medir concentraciones de hasta $1.000 \mu\text{g g}^{-1}$ (14). No obstante, la extracción secuencial realizada mostró que la disponibilidad de dicho contaminante en los sedimentos era reducida ya que apenas se encontró mercurio en la fracción intercambiable o unido a los ácidos húmicos, al estar la mayor parte asociado a sulfuros o en la fase residual, es decir, en forma de metacínabrio y cinabrio rojo (14). Además, en una primera aproximación a la componente biológica de este ecosistema se analizaron muestras de bivalvos hallándose contenidos de mercurio total en el intervalo $1,6-4,1 \mu\text{g g}^{-1}$ (15). En cuanto a la especiación, en los sedimentos prácticamente no se detectó metilmercurio, mientras que en las muestras biológicas se encontró que entre un 17 y un 40 % del mercurio total está en forma de metilmercurio, lo que supone una acumulación muy importante (14, 15). Estos valores a pesar de ser de una a cuatro veces mayores que los niveles de fondo de la región mostraron, en general, una disminución respecto a los encontrados en el primer período de estudio de la zona (1974-1977).

Estudios posteriores como el de Gray *et al.* (5) sirvieron para corroborar la fuerte contaminación por mercurio existente en la zona. En él se establece la distribución y transformación de las especies de mercurio en muestras tomadas en 2003, tras el cese de la actividad minera. Los residuos

de la mina ofrecieron concentraciones muy elevadas de mercurio que variaron de 160 a 34.000 $\mu\text{g g}^{-1}$, mientras que el contenido en monometilmercurio se encontraba entre 0,20 y 3.100 ng g^{-1} . Las aguas superficiales tomadas cerca de la mina de Almadén también estaban altamente contaminadas al presentar contenidos en mercurio de hasta 13.000 ng L^{-1} o de metilmercurio de 30 ng L^{-1} , lo cual se corresponde con los valores de los sedimentos que presentaron concentraciones de hasta 2.300 $\mu\text{g g}^{-1}$ y 82 ng g^{-1} de mercurio y metilmercurio, respectivamente. Asimismo se analizó mineral calcinado alcanzándose también altos niveles cuyos valores máximos fueron de 34.000 $\mu\text{g g}^{-1}$ de mercurio total y 3.100 ng g^{-1} de metilmercurio. Las altas concentraciones de metilmercurio encontradas en estas muestras pudieron ser posteriormente justificadas con la ayuda de diferentes técnicas de rayos X acopladas. Así, el empleo de dichas técnicas permitió demostrar la existencia de fases de mercurio relativamente solubles que podían ser movilizadas a través de diferentes procesos climáticos lo que implicaría una importante movilización de mercurio que podría afectar a la biota o a los seres humanos de la zona (16).

Los datos más actuales disponibles son los aportados en 2006 por Higuera *et al.* (17), que pretendieron dar una visión global de la distribución del mercurio en el distrito minero de Almadén, completando así un estudio previo que realizaron unos años antes sobre suelos de la Comarca (18) y el anteriormente comentado de Gray *et al.* (5). La distribución en los suelos reveló la existencia de valores elevados o incluso extremadamente elevados de mercurio (de hasta 8.889 $\mu\text{g g}^{-1}$), mientras que la concentración en los sedimentos o en las aguas fueron de hasta 16.000 $\mu\text{g g}^{-1}$ o 11,2 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. En cuanto a la contaminación atmosférica, las concentraciones más importantes encontradas fueron del orden de 14,0 $\mu\text{g m}^{-3}$, de ahí que ningún sistema (rocas, suelos, sedimentos, aguas, atmósfera, biota) del distrito de Almadén esté libre de una fuerte contaminación por mercurio. Así, se encontraron niveles alarmantes en algunos tejidos de los cangrejos ingeridos habitualmente por la población de la zona pues ofrecieron concentraciones de 9,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ en músculo y 26,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ en

hepatopáncreas. Asimismo se comprobó la existencia de altos niveles de mercurio en plantas, tal y como se señaló en otros dos trabajos publicados en 2006 (19, 20).

1.3 PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

Para realizar un estudio de la contaminación por mercurio en la Comarca de Almadén nos vamos a centrar en el ecosistema acuático ya que es el que ha merecido una mayor atención en otras zonas expuestas a este tipo de contaminación, sobre todo por las posibilidades de transformación y bioacumulación del mercurio en este ambiente. Como ya se indicó anteriormente, los ríos pueden jugar un papel destacado en el transporte del mercurio, de ahí la importancia que tendría estudiar el río Valdeazogues a su paso por la Comarca de Almadén, ya que una porción significativa de los residuos contaminados por mercurio que fueron generados por la actividad minera pudieron entrar, directa o indirectamente, en la cuenca de este río.

Atendiendo a la bibliografía, otro hecho a tener en cuenta sería el efecto que parece tener la creación de embalses en el hecho de que se produzca un aumento de las concentraciones de mercurio. La creación de reservas de agua por estancamiento de las aguas de los ríos y el consiguiente encharcamiento de tierras puede causar un considerable aumento de los contenidos de mercurio, especialmente en los peces que viven en esas aguas (21-30). Este fenómeno ha sido observado en muchos de los embalses construidos en las últimas décadas en regiones que no presentaban fuentes conocidas de mercurio, ni naturales ni antropogénicas, y que además se encontraban en zonas muy alejadas y muy diferentes en cuanto a sus características medioambientales. El incremento de mercurio producido tras el encharcamiento se refleja particularmente en un aumento de los niveles de monometilmercurio en aguas, sedimentos y biota de la nueva zona inundada (31-33). La principal causa del incremento de metilmercurio parece ser la metilación del mercurio inorgánico que se produce debido a que los nutrientes y sustancias orgánicas lábiles introducidas en el ambiente acuático

por los suelos y la vegetación recientemente sumergidos estimulan la metilación microbiana en los sedimentos (30, 34-36). Así, una reducción drástica del nivel de oxígeno podría estimular la metilación a través de bacterias sulfato-reductoras (37-39). Además, los cambios físico-químicos y biológicos que se producen en la zona inundada, como cambios en el régimen de temperaturas o en el estado redox, pueden también inducir la metilación (37). No obstante, en algunos casos, el aumento en el nivel de monometilmercurio se produce gracias a la liberación de los enlaces entre el CH_3Hg^+ y el suelo que existían antes de la inundación (31, 40). Este efecto de las aguas estancadas sobre el monometilmercurio parece ser temporal. Así, en las aguas los niveles superiores de metilmercurio se encuentran directamente después de la inundación, observándose un descenso de los mismos con el tiempo (31). En cuanto a los peces, los niveles de mercurio volverán a ser similares a los previos al encharcamiento tras un período de una o varias décadas o incluso tras un tiempo de recuperación superior (41, 42).

Teniendo en cuenta todo lo anterior, se consideró interesante estudiar no sólo la contaminación por mercurio en el río Valdeazogues a su paso por Almadén sino también en el embalse de La Serena para analizar tanto el posible efecto de la creación del embalse en los niveles de mercurio como la influencia que puede tener la entrada del río Valdeazogues en dicha presa, tras su paso por una zona altamente expuesta a la contaminación por mercurio como es la Comarca de Almadén. Además, este trabajo resulta de especial relevancia debido a que los estudios de la zona realizados hasta el momento se han centrado en la cuenca del río Valdeazogues pero ninguno de ellos ha estudiado la interacción Valdeazogues - La Serena a pesar de su importancia.

Para poder caracterizar bien este hidrosistema y tener un conocimiento más preciso de la contaminación del mismo, se tomaron no sólo muestras de agua sino también de sedimentos, dada la tendencia que tienen tanto el mercurio como otros elementos traza a acumularse en ellos así como al hecho de que los sedimentos parecen ser el primer paso en los procesos de biomagnificación acuática del mercurio. Por otro lado, también

es de gran interés, el estudio del intercambio entre los compartimentos bióticos y abióticos, por lo que se realizó también una aproximación a los niveles de mercurio en la biota de la zona estudiando peces de dos especies diferentes (*Lepomis gibbosus* y *Micropterus salmoides*) tomados del río Valdezogues y bivalvos de la especie *Unio pictorum* encontrados en uno de los puntos de muestreo del embalse de La Serena. Así pues, con los resultados obtenidos en cuanto a los niveles de mercurio en los distintos compartimentos acuáticos de la Comarca de Almadén se pretende estudiar el comportamiento del mercurio en esta zona, comparar los resultados con otros obtenidos en zonas expuestas a contaminación por mercurio y, por último, evaluar los riesgos toxicológicos a los que está expuesta la población.

2.- DETERMINACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN POR MERCURIO

Antes de proceder a la toma de muestras y a los correspondientes análisis de las mismas fue necesario diseñar una red de muestreo, teniendo en cuenta diferentes criterios tales como características geológicas e hidrológicas o la accesibilidad. Así, finalmente se establecieron diez puntos de muestreo, cuatro en el río Valdezogues a su paso por Almadén y seis en el embalse de La Serena (*figura 6.2*) que presentan las siguientes características:

- Todos los puntos excepto el V-1 y V-2 se localizan aguas abajo de Almadén y están numerados en orden ascendente siguiendo el curso del río Valdezogues.
- Los puntos V-1 y V-2 pese a estar aguas arriba de la mina de Almadén se encuentran bajo la influencia de las minas de Las Cuevas y el Entredicho aparte de la contribución atmosférica.
- El punto V-3 está situado después de los vertidos procedentes de la mina de Almadén.

- Los puntos del S-1 al S-3 están situados en la cola del embalse que corresponde con la entrada del río Valdeazogues mientras que el S-4 está en la entrada del río Esteras.
- Los puntos S-5 y S-6 se sitúan en la zona de “mezcla” de ambas entradas.

La distancia a la que se encuentra cada uno de los puntos de muestreo respecto a Almadén se tratará de relacionar con los contenidos en mercurio encontrados, ya que se considera que el hecho de encontrarse más o menos cerca de la fuente de exposición del contaminante puede ejercer una cierta influencia. Las distancias aproximadas a las que se encuentran cada uno de los puntos respecto a Almadén midiéndolas en la dirección del curso del río se indican en la *tabla 6.1*. A la hora de establecer dichas distancias se consideran como positivas aquellas que se miden aguas abajo por lo que los únicos puntos a los que se les ha asignado una distancia negativa son V-1 y V-2. Además en la *tabla 6.1* se ofrece una breve descripción de la localización de cada uno de los puntos de muestreo seleccionados.

Tabla 6.1. Localización y descripción de los puntos de muestreo

Punto muestreo	Distancia (Km)	Descripción
V-1	-8,0	Puente Almadenejos
V-2	-2,0	Charro Los Carrizos
V-3	9,7	Puente de Hierro
V-4	19,0	Guadalmez (Puente vía tren)
S-1	34,0	Áridos Pedroche
S-2	37,8	Puente Capilla - Peñalsordo
S-3	41,7	Vadem
S-4	50,0	Entrada río Esteras
S-5	58,3	Peñalsordo
S-6	68,3	Puente Puebla de Alcocer

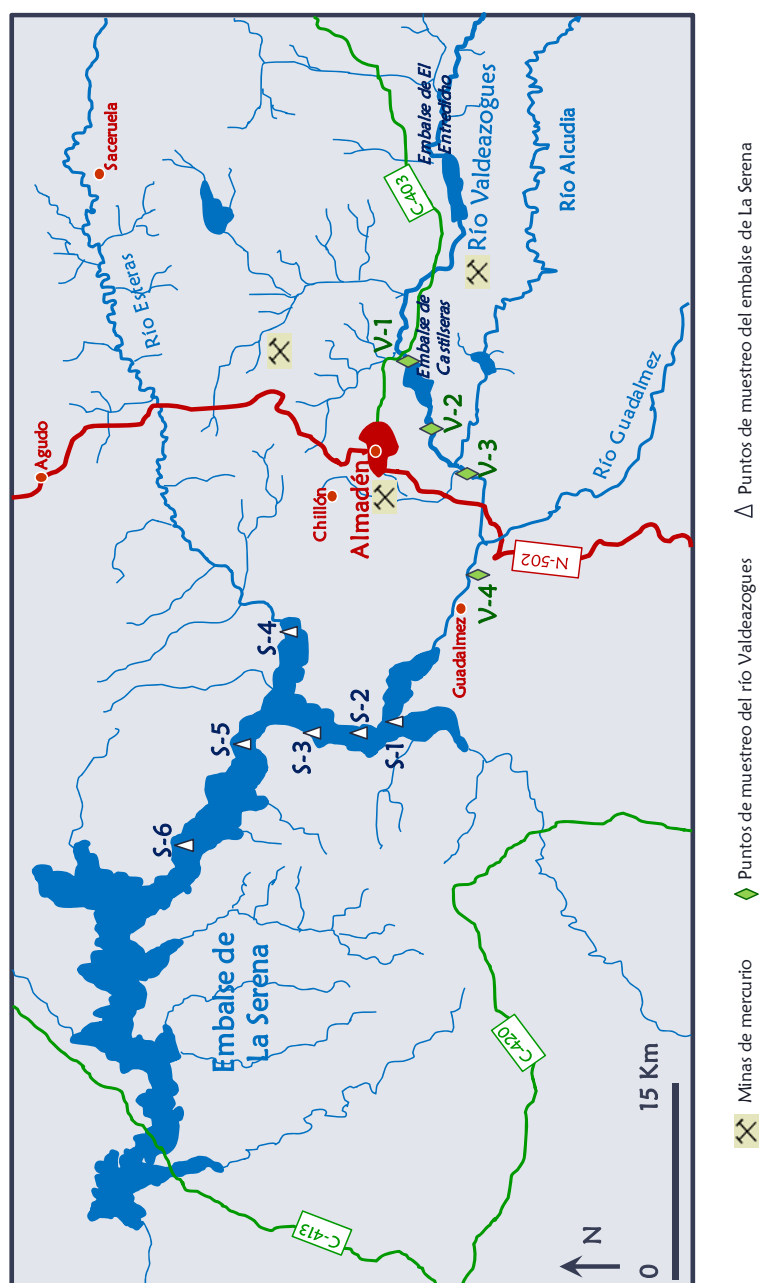


Figura 6.2. Mapa de la zona de Almadén estudiada donde se localizan aproximadamente los puntos de muestreo

De cada uno de estos diez puntos de muestreo se tomaron tanto aguas como sedimentos, tal y como se describió en el Capítulo II. Para las aguas se realizaron tres muestreos estacionales que se corresponden con el otoño de 2005 (septiembre de 2005), el invierno de 2006 (enero de 2006) y el verano de 2006 (julio de 2006), ya que se consideró que en la medida de los parámetros de este tipo de muestras podía haber una influencia estacional importante. Sin embargo, los sedimentos sólo se recogieron en el último de los tres muestreos de las aguas, es decir, en verano de 2006. En este muestreo no fue posible tomar aguas ni sedimentos del punto S-4 ya que debido al clima semiárido de la zona se encontraba seco. Por su parte, los bivalvos fueron tomados únicamente en uno de los puntos del embalse de La Serena (S-5) en verano de 2006, mientras que los peces proceden de una zona del río Valdeazogues correspondiente al punto V-4.

A continuación se van a presentar los resultados obtenidos estructurados en función del tipo de muestra (agua, sedimento o biota) conjuntamente para el río Valdeazogues o del embalse de La Serena.

2.1 AGUAS

Las muestras de agua tomadas fueron analizadas no sólo en cuanto a su contenido en mercurio sino que se midieron también otros parámetros para caracterizar hidroquímicamente el sistema acuático del que proceden, utilizando los métodos analíticos expuestos en el Capítulo II.

2.1.1 CARACTERIZACIÓN HIDROQUÍMICA

Para caracterizar las muestras se midieron parámetros no específicos como temperatura, pH, conductividad, sólidos totales en suspensión (TSS) y disueltos (TSD), parámetros relacionados con la materia orgánica y el estado trófico del agua como carbono orgánico total (TOC), nitrógeno orgánico total (TON) y clorofila *a* y algunos metales como hierro y manganeso. Los resultados obtenidos en los diferentes muestreos estacionales se presentan agrupados en dos categorías: parámetros no específicos (*tablas 6.2, 6.3 y 6.4*) e indicadores del estado trófico y metales traza (*tablas 6.5, 6.6 y 6.7*).

Tabla 6.2. *Parámetros no específicos de las aguas (septiembre de 2005)*

Punto muestreo	Temperatura (°C)	pH	Conductividad ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	TSS (mg L ⁻¹)	TSD (mg L ⁻¹)
V-1	24,3	8,90	734	2,3	317,0
V-2	25,1	7,75	545	40,0	323,7
V-3	24,3	8,28	923	4,0	488,0
V-4	22,3	8,80	512	15,7	270,7
S-1	25,0	7,95	279	3,0	177,7
S-2	25,3	7,90	293	3,0	170,0
S-3	22,3	8,01	297	68,3	199,3
S-4	21,7	7,68	295	30,7	114,3
S-5	25,2	8,12	287	132,3	166,3
S-6	25,8	7,80	283	2,0	87,7

Tabla 6.3. *Parámetros no específicos de las aguas (enero de 2006)*

Punto muestreo	Temperatura (°C)	pH	Conductividad ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	TSS (mg L ⁻¹)	TSD (mg L ⁻¹)
V-1	9,5	7,62	569	0,7	306,7
V-2	10,9	7,42	501	2,7	268,3
V-3	9,6	7,31	913	2,7	430,0
V-4	8,1	7,42	640	26,3	336,0
S-1	10,4	7,55	312	6,7	158,7
S-2	10,4	7,60	304	1,3	157,7
S-3	7,9	7,66	315	5,0	167,3
S-4	9,8	7,51	293	(*)	(*)
S-5	11,0	7,66	95	2,7	162,7
S-6	11,1	7,50	292	11,7	139,7

(*): No fue posible medir este parámetro por un problema fortuito con esa muestra

Tabla 6.4. *Parámetros no específicos de las aguas (julio de 2006)*

Punto muestreo	Temperatura (°C)	pH	Conductividad ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	TSS (mg L^{-1})	TSD (mg L^{-1})
V-1	26,5	8,51	645	18,7	370,3
V-2	29,3	7,51	524	8,7	344,7
V-3	29,7	8,54	828	22,7	622,0
V-4	30,1	9,12	678	32,0	467,3
S-1	29,2	8,74	282	15,8	183,3
S-2	26,0	8,60	288	10,3	154,7
S-3	25,5	8,29	298	27,3	193,7
S-5	27,1	8,34	260	6,0	186,3
S-6	25,8	7,95	285	52,7	155,0

De las tablas anteriores donde se recogen los parámetros no específicos de las aguas en los tres muestreos estacionales realizados se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Los datos correspondientes a la **temperatura** del agua, nos indican una variación anual muy marcada con máximos en verano y mínimos en invierno, con diferencias del orden de unos 20 °C.
- El **pH** no presenta oscilaciones considerables aunque, no obstante, se observan variaciones estacionales de aproximadamente una unidad entre los pH mínimos recogidos en invierno (en torno a 7,5) y los pH máximos (de hasta 9,0) en verano.
- En cuanto a los valores de **conductividad** existen importantes diferencias entre ambas zonas de muestreo ya que las procedentes del río Valdeazogues presentan valores superiores a la del embalse de La Serena. Esto se debe a que la conductividad en un agua natural superficial depende del tipo de especies químicas presentes

así como de su concentración y, por tanto, del tipo de terreno que atraviesa. Además se observa como el aumento en el contenido en sales como consecuencia de un aporte contaminante afecta a la conductividad como ocurre, por ejemplo, en el punto V-3 donde se reciben aguas residuales y por tanto se obtienen los valores más altos de conductividad.

- En lo que respecta a los **sólidos totales en suspensión**, que engloban la fracción suspendida y la fracción coloidal de las aguas, no se puede establecer una tendencia clara ya que existe una gran variabilidad entre los distintos puntos de muestreo y las épocas del año, aunque se observa que los valores más bajos se obtienen en invierno. Esta diversidad de valores y, en especial, las altas concentraciones obtenidas para algunos puntos del embalse de La Serena podrían deberse a la naturaleza coloidal que pueden tener estas partículas que les viene dada por las pequeñas cargas eléctricas que poseen.
- Los **sólidos disueltos** están relacionados con el grado de mineralización del agua ya que son iones de sales minerales que el agua ha conseguido disolver a su paso y que, por tanto, están relacionados con la conductividad del agua. Por este motivo los sólidos disueltos presentan siempre valores del orden de 2 ó 3 veces mayores en las muestras del río Valdeazogues que en las del embalse de La Serena ya que, como se indicó anteriormente, la conductividad en las aguas del río fue siempre superior a las del embalse. Sin embargo, los sólidos disueltos a diferencia de otros parámetros no muestran una influencia estacional ya que los valores encontrados son prácticamente del mismo orden para las diferentes estaciones.

Tabla 6.5. Indicadores del estado trófico y metales (septiembre de 2005)

Punto muestreo	TOC (mg L ⁻¹)	TON (mg L ⁻¹)	Clorofila <i>a</i> (µg L ⁻¹)	Fe (mg L ⁻¹)	Mn (mg L ⁻¹)
V-1	20,29	3,00	2,09	0,333	0,101
V-2	16,45	2,23	0,42	0,500	0,051
V-3	11,15	15,56	108,4	0,100	0,234
V-4	14,01	5,10	8,34	0,600	0,134
S-1	8,31	1,53	3,34	0,333	0,034
S-2	8,39	1,24	0,42	0,267	0,018
S-3	8,47	1,42	2,92	0,500	0,034
S-4	7,70	1,54	0,42	0,533	0,051
S-5	7,80	1,58	0,83	0,133	0,051
S-6	9,03	1,40	0,42	0,067	0,051

Tabla 6.6. Indicadores del estado trófico y metales (enero de 2006)

Punto muestreo	TOC (mg L ⁻¹)	TON (mg L ⁻¹)	Clorofila <i>a</i> (µg L ⁻¹)	Fe (mg L ⁻¹)	Mn (mg L ⁻¹)
V-1	12,42	2,29	9,59	0,133	0,034
V-2	11,26	0,74	0,42	0,200	0,051
V-3	14,09	13,99	17,51	0,200	0,384
V-4	20,52	4,13	10,84	1,433	0,517
S-1	3,25	0,94	3,75	0,167	0,051
S-2	4,96	0,82	1,67	0,133	0,034
S-3	5,81	0,83	1,25	0,100	0,018
S-4	(*)	(*)	(*)	0,700	0,067
S-5	5,05	0,69	4,17	0,033	0,034
S-6	6,12	0,78	1,25	0,033	0,051

(*): No fue posible medir este parámetro por un problema fortuito con esa muestra

Tabla 6.7. Indicadores del estado trófico y metales (julio de 2006)

Punto muestreo	TOC (mg L ⁻¹)	TON (mg L ⁻¹)	Clorofila <i>a</i> (µg L ⁻¹)	Fe (mg L ⁻¹)	Mn (mg L ⁻¹)
V-1	22,97	1,40	72,14	0,300	0,051
V-2	21,10	1,29	0,58	0,333	0,051
V-3	25,89	10,57	161,0	0,367	0,067
V-4	15,42	4,25	155,5	0,167	0,051
S-1	8,88	2,23	29,61	0,767	0,051
S-2	8,61	2,35	31,69	0,133	0,034
S-3	9,05	2,92	32,94	0,400	0,051
S-5	8,75	1,52	2,92	0,233	0,034
S-6	8,13	1,01	1,67	0,567	0,034

Las tablas anteriores que recogen parámetros referentes a la materia orgánica y al estado trófico del agua así como ciertos metales traza permiten deducir lo siguiente:

- El **carbono orgánico total** se corresponde con una gran diversidad de compuestos orgánicos en diferentes estados de oxidación. Los contenidos obtenidos para los distintos muestreos estacionales ponen de manifiesto siempre una clara diferencia entre el río y el embalse, como era de esperar. Así pues, los TOC en los puntos V-n toman valores generalmente del doble de los correspondientes puntos S-n para un mismo muestreo. Además se observa que los valores son inferiores en el invierno tanto para el río como para el embalse aunque dichos valores son muy superiores a los encontrados en otros ecosistemas acuáticos.
- Una tendencia similar se encuentra en el **nitrógeno orgánico total** ya que los valores del embalse de La Serena son inferiores en invierno y menores a los del río con excepción del punto V-2.

- También se observa que los TON máximos los presenta el punto V-3 debido de nuevo a la contribución de los vertidos que llegan hasta este punto procedente de las poblaciones de Almadén y Chillón.
- Los valores de **clorofila a** pueden ser utilizados como indicadores de la biomasa fitoplanctónica. Dichos valores no presentan una misma tendencia en todos los muestreos estacionales. Sin embargo, el valor menor se da en todos los casos en el punto de muestreo V-2 que también ofreció un comportamiento anómalo respecto al resto de los puntos del río Valdeazogues para otros parámetros. De igual manera, los valores superiores los registró de nuevo el punto V-3 que también tenía TOC y TON altos.
- Por último, en cuanto a los metales traza estudiados, es decir, **hierro y manganeso**, se observan diferentes tendencias para cada uno de ellos. Mientras que los valores para el hierro muestran una influencia estacional recogiendo los contenidos menores en invierno, en el caso del manganeso no se observa tan claramente dicha tendencia. Además los contenidos en hierro de las aguas son del orden de tres veces mayores que los de manganeso.

2.1.2 DISTRIBUCIÓN DEL MERCURIO ENTRE LAS FRACCIONES DISUELTA Y PARTICULADA Y ESPECIACIÓN

El mercurio es un metal que en las aguas naturales generalmente se encuentra unido a los sólidos en suspensión (43, 44). Por ello, para conocer verdaderamente el contenido en mercurio de un agua es necesario no sólo determinar su concentración en la fracción disuelta sino que también hay que tener en consideración la fracción particulada. Según lo recogido en la bibliografía (43, 45-48), el contenido en mercurio particulado suele ser muy superior al de la correspondiente fracción disuelta. Normalmente supone al menos un 80-85 % del mercurio total de las aguas considerando ambas fracciones, llegando incluso a corresponderse con un 95-99 %. Por este

motivo, las aguas tomadas en los diferentes muestreos estacionales fueron filtradas para poder determinar por separado el contenido de mercurio total de la fracción disuelta y la fracción particulada. En ambos casos las muestras (aguas o filtros) fueron analizadas utilizando el sistema de detección por fluorescencia atómica con generación de vapor frío y aplicando los métodos de análisis descritos en el capítulo III.

Para evaluar la distribución del mercurio entre las fases disuelta y particulada de las aguas así como establecer un modelo de distribución y biodisponibilidad de dicho elemento tóxico en ambientes acuáticos se suele utilizar el coeficiente de reparto K_d , que se define como el cociente entre la concentración de mercurio en la fracción disuelta y particulada. Existe una cierta controversia en cuanto a las unidades de dicho parámetro ya que en la bibliografía consultada se recogen diferentes forma de calcularlo si bien, en su mayor parte, K_d queda finalmente expresado en forma de una unidad de volumen partido por una unidad de masa ($L\ kg^{-1}$ (43, 46), $L\ g^{-1}$ (47), $L\ mg^{-1}$ (48)). Además, en ocasiones, la distribución entre las fases se calcula por medio de un coeficiente K_d corregido en función de los sólidos totales en suspensión (48). En nuestro caso, los valores de K_d se calcularon utilizando la siguiente expresión (43, 46):

$$K_d = \frac{[THg]_p}{[THg]_d}$$

Donde:

- $[THg]_p$ es la concentración de mercurio total particulado expresado en $nmol\ kg^{-1}$
- $[THg]_d$ es la concentración de mercurio total disuelto en $nmol\ L^{-1}$

Por otro lado, para completar el estudio de la contaminación por mercurio en las aguas es de particular interés la determinación de monometilmercurio, ya que el análisis del contenido total nos da una idea de la extensión de la contaminación acumulada y proporciona una evaluación de la toxicidad potencial a largo plazo pero no es suficiente para entender el impacto medioambiental de este metal. Debido a que para el análisis de

monometilmercurio en aguas se requiere de una técnica muy sensible y de un método analítico que permita alcanzar límites de detección extremadamente bajos no fue posible realizar estos análisis con el sistema híbrido GC-pyro-AFS desarrollado. Así pues, esta determinación se llevó a cabo utilizando un sistema acoplado de cromatografía de gases y espectrometría de masas con fuente de plasma acoplado inductivamente (GC-ICP-MS) en el *Laboratoire de Chimie Analytique, Bio-Inorganique et Environnement* del *CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique)* de la Universidad de Pau (Francia). No obstante, sólo fue posible realizar la determinación de monometilmercurio en las aguas tomadas en septiembre de 2005.

Los resultados obtenidos en los análisis de mercurio en aguas se van a presentar en función del muestreo estacional en las *tablas 6.8, 6.9 y 6.10*, en las que se indica la concentración total de mercurio en la fracción disuelta (THg_d) y particulada (THg_p), el logaritmo del coeficiente de distribución K_d y, en su caso, la concentración de monometilmercurio.

Tabla 6.8. Resultados análisis de mercurio en aguas (septiembre de 2005)

Punto muestreo	THg _d (ng L ⁻¹)	THg _p (µg g ⁻¹)	log K _d	CH ₃ Hg ⁺ (ng L ⁻¹)	(%)
V-1	8,4	1,64	5,29	2,60	30,9
V-2	11,4	3,57	5,50	0,33	2,9
V-3	80,0	6,26	4,89	4,93	6,2
V-4	65,7	6,69	5,01	1,04	1,6
S-1	7,8	0,41	4,72	0,17	2,2
S-2	6,0	0,92	5,14	0,16	2,7
S-3	19,5	3,14	5,21	0,30	1,6
S-4	13,3	3,05	5,36	0,10	0,8
S-5	29,9	0,40	4,13	0,08	0,3
S-6	11,1	1,01	4,96	0,04	0,4

Tabla 6.9. Resultados análisis de mercurio en aguas (enero de 2006)

Punto muestreo	THg _D (ng L ⁻¹)	THg _P (μg g ⁻¹)	log K _d
V-1	17,9	0,51	4,45
V-2	11,9	0,09	3,89
V-3	24,2	9,27	5,58
V-4	30,0	24,5	5,91
S-1	10,0	9,81	5,99
S-2	11,3	5,90	5,72
S-3	12,7	11,4	5,95
S-4	11,1	1,80	5,21
S-5	54,8	0,46	3,99
S-6	4,1	0,16	4,57

Tabla 6.10. Resultados análisis de mercurio en aguas (julio de 2006)

Punto muestreo	THg _D (ng L ⁻¹)	THg _P (μg g ⁻¹)	log K _d
V-1	3,8	3,25	5,93
V-2	93,4	5,64	4,78
V-3	87,7	43,0	5,69
V-4	136,1	4,08	4,48
S-1	9,9	10,9	6,04
S-2	28,4	86,8	6,49
S-3	8,3	33,4	6,60
S-4	(*)	(*)	(*)
S-5	10,9	42,3	6,59
S-6	2,5	7,42	6,48

(*): No fue posible tomar muestras de ese punto en ese muestreo

Las concentraciones de mercurio total disuelto en las aguas filtradas de los diferentes muestreos estacionales realizados oscilaron entre 2,5 y 136,1 ng L⁻¹. Estas concentraciones son de uno a dos órdenes de magnitud menores que los límites establecidos por diferentes organismos como indicadores de la calidad de las aguas. Así, los contenidos en mercurio son inferiores tanto a la concentración máxima recomendada por la United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA) que establece 2,4 µg L⁻¹ como límite para aguas de arroyos (49), así como al nivel máximo de contaminación permitido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y por la legislación española (1 µg L⁻¹) para agua potable (50, 51). Sin embargo, la mayoría de las muestras analizadas exceden la concentración de 12 ng L⁻¹ (figura 6.3) establecida por la U.S.EPA como concentración máxima de mercurio permitida para evitar efectos crónicos en la vida de los seres acuáticos (49).

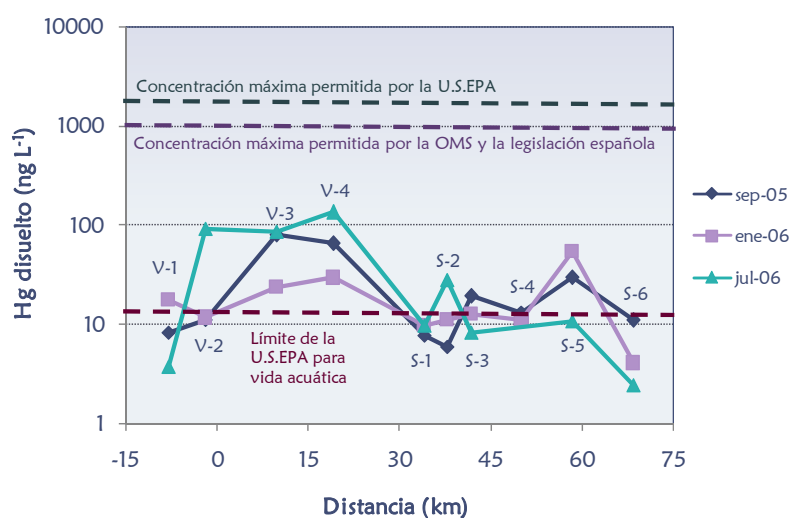


Figura 6.3. Concentración de mercurio disuelto total en las aguas frente a la distancia con respecto a Almadén

En la figura 6.3 se observa que no hay una correlación directa entre los contenidos en mercurio y la distancia respecto a Almadén ya que dichas concentraciones no van decreciendo a lo largo del cauce del río sino que van

a depender de otros factores. En general los valores más altos (de hasta 136,1 ng L⁻¹) se encuentran en los puntos V-3 y V-4, que son los más próximos aguas abajo a la mina de Almadén, mientras que los puntos aguas arriba (V-1 y V-2) y del embalse de La Serena tienen contenidos más bajos de mercurio, con la excepción del punto S-5 en el muestreo de enero de 2006 (54,8 ng L⁻¹). En cuanto a la variabilidad estacional, en el río Valdeazogues los valores máximos se recogen en verano, excepto para V-1. Por su parte, en el embalse de La Serena no existe una tendencia clara ya que en algunos puntos, como S-1 y S-4, se encuentran valores similares para las diferentes estaciones mientras que en otros sí que existe una influencia estacional quizá debido al efecto de otros parámetros, como se estudiará posteriormente.

En cuanto a las concentraciones de mercurio particulado oscilan entre 90 ng g⁻¹ y 86,8 µg g⁻¹ por lo que abarcan un intervalo muy grande. En general, en los puntos correspondientes al río Valdeazogues los contenidos en mercurio particulado superiores se corresponden con aquellos puntos que también habían ofrecido altos niveles de mercurio en la fracción disuelta (V-3 y V-4). Este hecho sólo se comprueba en el embalse de La Serena para el último muestreo donde los valores máximos se dan para S-2 y S-5. El resto de muestreos no exhiben una tendencia clara si bien parece haber una marcada influencia estacional ya que los valores obtenidos en verano son muy superiores a los de las otras épocas del año, quizá debido a corresponderse con el período de mayor sequía.

Al relacionar los contenidos en mercurio encontrados en la fracción disuelta y particulada por medio del coeficiente de reparto, se obtuvieron valores para el logarítmico de K_d que varían entre 3,9 y 6,6. Estos valores de K_d indican perfiles de distribución del mercurio claramente dominados por el mercurio particulado con porcentajes del orden del 90-99 % del mercurio total de las aguas, lo que está en concordancia con las distribuciones encontradas en otros ecosistemas acuáticos estudiados (43, 45-48). Además, se puede observar que en las muestras del embalse de La Serena los valores más altos del logaritmo de K_d se corresponden, en la mayoría de los casos, con las concentraciones más bajas de mercurio en la fracción disuelta lo que

indica que los sólidos totales en suspensión (TSS) juegan un papel muy importante en el transporte y la distribución del mercurio en el embalse. Este hecho se puede confirmar en la *figura 6.4* donde se aprecia como los valores de K_d tienden a descender al aumentar los sólidos en suspensión, pero únicamente en el caso de las muestras del embalse de La Serena. Esta tendencia, conocida como “efecto de las partículas en la concentración”, ha sido descrita también para otros metales traza tanto en experiencias de laboratorio como en datos de campo (52, 53). En general, este efecto se atribuye a un artefacto analítico asociado a coloides que no son retenidos en los filtros lo que conduce a una sobreestimación en la concentración del metal en la fracción disuelta (53).

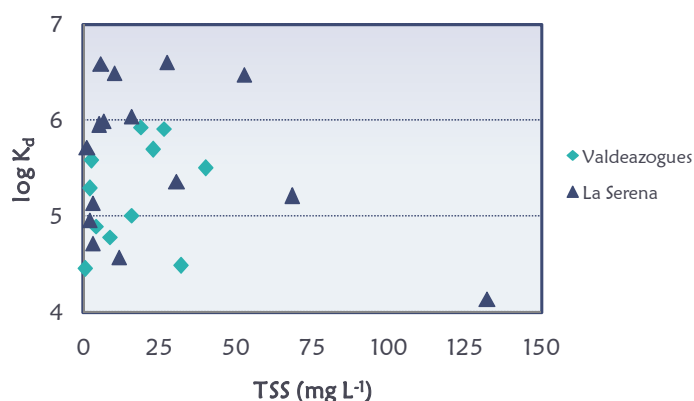


Figura 6.4. Correlación entre el $\log K_d$ y los sólidos totales en suspensión en las aguas del río Valdeazogues y el embalse de La Serena

Por otro lado, en lo que respecta a las concentraciones de monometilmercurio (*tabla 6.8*) existen notables diferencias entre los contenidos encontrados en las muestras correspondientes al río Valdeazogues y el embalse de La Serena. En el caso de las muestras del río se encuentran valores preocupantes especialmente en aquellos puntos que también habían ofrecido las concentraciones más altas de mercurio total disuelto y particulado. Así el punto V-3, situado después de los vertidos que procedían

de la mina de Almadén, alcanza casi los 5 ng L⁻¹ de metilmercurio. Sin embargo, destaca el hecho de que uno de los puntos localizado aguas arriba de la mina de Almadén (V-1) presente el segundo mayor contenido en metilmercurio pese a que sus concentraciones de mercurio total eran del orden de las del embalse de La Serena. Mientras que el otro punto aguas arriba (V-2) ofrece un valor del orden de los encontrados en el embalse de La Serena lo que parece indicar una cierta dispersión del metilmercurio aguas arriba de la mina. Tras el máximo encontrado en el punto V-3 se observa como a medida que se avanza en el cauce del río el contenido en metilmercurio va descendiendo y lo mismo ocurre a lo largo del embalse de La Serena en orden ascendente de los puntos de muestreo, salvo para S-3 que presenta la máxima concentración de metilmercurio de las muestras tomadas del embalse. No obstante, no se puede afirmar que la desembocadura del río Valdeazogues en el embalse de La Serena ejerza una influencia importante en cuanto a los contenidos de metilmercurio ya que los valores de los puntos S-n son en todos los casos inferiores a 0,3 ng L⁻¹ lo que indica que no se produce una metilación considerable puesto que dichas concentraciones no suponen en ninguno de los casos más del 3 % del mercurio total. Por su parte, en el río Valdeazogues los porcentajes en metilmercurio oscilan también entre el 1,5 y 6 %, con la excepción del punto V-1 donde su contenido está en torno al 30 % del contenido total en mercurio disuelto.

Debido a que no existen valores de referencia en cuanto a la concentración de metilmercurio en aguas, vamos a comparar nuestros resultados con los valores encontrados para el mercurio total y el metilmercurio en otros estudios de ríos y lagos pertenecientes a zonas no contaminadas y cuyos niveles pueden considerarse como “control” a escala mundial (54, 55), así como con los niveles “fondo” de una zona expuesta a la contaminación por mercurio (45) y de un estudio anterior realizado en la Comarca de Almadén (5) (*tabla 6.11*). (En todos los casos, los contenidos de mercurio reflejados en la tabla corresponden a aguas analizadas sin haber sido filtradas previamente).

Tabla 6.11. Niveles control de mercurio y metilmercurio en ríos y lagos

Localización	Hg total (ng L ⁻¹)	CH ₃ Hg ⁺ (ng L ⁻¹)
Lago Baikal en Rusia (54)	0,14-2,02	0,002-0,161
Arroyos y lagos de Antártida (55)	0,27-1,9	0,02-0,23
Arroyos control en Alaska (45)	0,6-1,8	0,04-0,20
Control próximo a Almadén (5)	9,1-43	0,048-0,340

Como se observa en la *figura 6.5*, donde se relacionan las concentraciones de metilmercurio y las de mercurio total en la fracción disuelta a través de un gráfico de dispersión, todas las relaciones quedan fuera del área considerada como “no contaminada”, que viene delimitada por unas concentraciones de mercurio total y metilmercurio de 2 y 0,2 ng L⁻¹, respectivamente, teniendo en cuenta los niveles establecidos como control indicados en *tabla 6.11*.

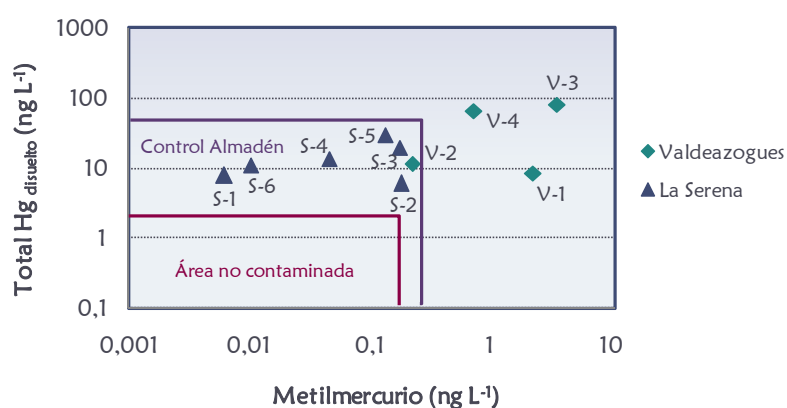


Figura 6.5. Concentración de mercurio total disuelto frente a la concentración de metilmercurio en las muestras de aguas tomadas en la Comarca de Almadén en septiembre de 2005

Sin embargo, no ocurre lo mismo al considerar el área delimitada por los valores “control” en la zona de Almadén. En este caso, todos los puntos del embalse de La Serena aparecen situados dentro de ella, lo que indica que los niveles tanto de mercurio total como de metilmercurio encontrados son del orden de los valores de fondo de la Comarca. Además, cabe resaltar que el punto V-2 presenta un comportamiento similar a las muestras tomadas en el embalse de La Serena. Por tanto, pese a que de forma global podemos afirmar que ambas zonas de muestreo presentan un grado de contaminación superior al de otros sistemas acuáticos, al no quedar ninguno de los puntos dentro del área no contaminada, existen ciertas diferencias entre las muestras del río Valdezogues y el embalse de La Serena. Así pues, se observa que las muestras verdaderamente contaminadas considerando tanto el mercurio total como el monometilmercurio son las del río Valdezogues salvo el punto V-2, situado aguas arriba, que se comporta como las muestras del embalse de La Serena.

2.1.3 RELACIONES ENTRE EL MERCURIO Y OTROS FACTORES MEDIOAMBIENTALES

La aparición y distribución de las especies de mercurio en los ambientes acuáticos parece estar regulada por ciertos parámetros físico-químicos. Así, para tratar de justificar la influencia de los diferentes parámetros medidos para la caracterización del hidrosistema en los contenidos de mercurio encontrados se trataron estadísticamente todos estos datos. Para ello se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson (r) para un nivel de significación del 5 % ($p < 0,05$), lo que indica que las correlaciones que sean significativas sólo se deberían en un 5 % al efecto del azar. Para conocer las tendencias generales así como las que se producen estacionalmente, se realizó tanto una correlación general utilizando todos los datos (*tabla 6.12*), como correlaciones independientes para cada uno de los muestreos (*tablas 6.13, 6.14 y 6.15*). Los valores en negrita indican correlaciones significativas, es decir, con un valor de $p < 0,05$.

Tabla 6.12. Matriz de correlaciones de las aguas de los tres muestreos (n=28)

	THg _d	THg _p	Log K _d	Temp.	pH	Cond.	TSS	TSD	TOC	TON	Clorofila	Fe	Mn	Distancia
THg _d	1,00													
THg _p	0,07	1,00												
Log K _d	-0,33	0,61	1,00											
Temp.	0,30	0,21	0,17	1,00										
pH	0,36	0,30	0,19	0,70	1,00									
Cond.	0,45	-0,02	-0,07	0,05	0,18	1,00								
TSS	0,03	-0,08	-0,09	0,28	0,13	-0,15	1,00							
TSD	0,65	0,07	-0,09	0,18	0,28	0,91	-0,08	1,00						
TOC	0,41	0,09	0,02	0,32	0,30	0,75	-0,03	0,79	1,00					
TON	0,45	0,14	0,02	0,06	0,15	0,79	-0,12	0,74	0,37	1,00				
Clorofila	0,69	0,24	0,02	0,40	0,56	0,58	0,00	0,77	0,48	0,58	1,00			
Fe	-0,06	0,08	0,34	0,07	0,04	0,12	0,18	0,10	0,37	0,01	-0,07	1,00		
Mn	0,13	0,06	0,09	-0,33	-0,21	0,57	-0,06	0,41	0,36	0,60	0,08	0,54	1,00	
Distancia	-0,28	0,08	0,14	-0,01	-0,13	-0,76	0,26	-0,72	-0,73	-0,36	-0,31	-0,14	-0,27	1,00

Como se comprueba en la *tabla 6.12*, las concentraciones de mercurio disuelto se correlacionan especialmente con los contenidos en clorofila *a* ($r=0,69$), lo que indica que la variación en el estado trófico de las aguas influye en los niveles de mercurio. Asimismo existe una correlación significativa y positiva con los sólidos disueltos ($r=0,65$) y con la conductividad ($r=0,45$) que a su vez son variables que, como ya se indicó, están estrechamente relacionadas ($r=0,91$). El hecho de que el mercurio disuelto se correlacione con los sólidos totales disueltos y no con los sólidos en suspensión se debe a que probablemente el mercurio se estabilice en esta fracción gracias a la complejación con hidróxidos u otras asociaciones disueltas y/o coloidales (56, 57). El mercurio disuelto también está correlacionado, pero en menor medida, con el TOC y el TON con r de 0,41 y 0,45, respectivamente. Esto indica que el carbono orgánico disuelto puede desempeñar un cierto papel en el transporte del mercurio ya que existe complejación entre el mercurio y los ligandos orgánicos disueltos (56, 58). En cuanto a las concentraciones de mercurio total en la fracción particulada, éstas únicamente muestran correlaciones significativas con el logaritmo del coeficiente de reparto del mercurio entre ambas fases ($r=0,61$). Por último, al considerar de forma global todos los datos obtenidos, se comprueba que las concentraciones de los metales traza analizados (hierro y manganeso) están relacionadas entre sí ($r=0,54$) pero, sin embargo, no existen relaciones destacables entre el mercurio y dichos metales.

Al realizar las correlaciones considerando de forma independiente los resultados de cada muestreo se observan comportamientos diferentes a las tendencias generales. Así, en las muestras de septiembre de 2005 (*tabla 6.13*) el mercurio en la fracción disuelta se correlaciona muy bien con el mercurio particulado ($r=0,82$) lo que indica que la distribución del mercurio sigue un comportamiento similar en ambas fases para los diferentes puntos de muestreo. Este hecho influye en que el mercurio de las dos fracciones presente una respuesta parecida ante algunos factores. Así, en ambos casos, se observa correlación significativa y positiva con los sólidos totales disueltos, el nitrógeno orgánico total y el manganeso. Además existe una cierta influencia con los contenidos en clorofila *a*, que sólo llega a ser significativa

con el mercurio disuelto ($r=0,77$). La fuerte correlación existente entre el manganeso y el mercurio disuelto puede deberse a que gran parte de la fracción disuelta se encuentra realmente en forma coloidal, como indicaba el ligero “efecto de las partículas en la concentración” observado. Por ello pueden producirse reacciones de adsorción o complejación del mercurio en los hidróxidos de manganeso no sólo con la fracción particulada sino también con la fase coloidal (57). Sin embargo, en el caso del hierro no se observa el mismo comportamiento pues este metal presenta una pobre correlación negativa con el mercurio disuelto. Todo ello parece indicar que en estas muestras se produce una importante complejación del mercurio con los hidróxidos de manganeso pero no con los de hierro.

En cuanto a los otros dos muestreos se observa un comportamiento diferente ya que los contenidos en mercurio en la fracción disuelta y particulada no se encuentran relacionados entre sí. Así pues, en el muestreo realizado en invierno (*tabla 6.14*), el mercurio disuelto no se ve especialmente influido por ninguno de los factores estudiados al no presentar correlaciones destacables con ellos. Sin embargo, la temperatura ejerce una influencia sobre la fracción particulada pues existe correlación significativa y negativa con dicha magnitud ($r=-0,77$). Asimismo la fracción particulada correlaciona de forma positiva con los sólidos en suspensión ($r=0,75$), el hierro ($r=0,84$) y el manganeso ($r=0,76$). Por último, el muestreo correspondiente a julio de 2006 (*tabla 6.15*) no presenta tendencias destacables ya que en este caso no se observa relación entre el mercurio y el hierro o el manganeso lo que indica que a mayor temperatura de las aguas se ven menos favorecidas las reacciones de complejación con los hidróxidos de estos metales. No obstante, hay correlaciones significativas para el mercurio disuelto con la temperatura ($r=0,79$), los sólidos totales disueltos ($r=0,74$) y la conductividad ($r=0,69$). Además cabe destacar la correlación negativa que presenta el mercurio disuelto con el logaritmo del coeficiente de distribución ($r=-0,90$), ya que en los otros muestreos pese a ser la tendencia también negativa no era significativa. Esta misma tendencia la presentan los sólidos disueltos que también están inversamente relacionados con el logaritmo de K_d pese a no llegar a ser significativa dicha relación ($r=-0,66$).

Tabla 6.13. Matriz de correlaciones de las aguas de septiembre de 2005 (n=10)

	THg _D	THg _P	Log K _d
THg _D	1,00		
THg _P	0,82	1,00	
Log K _d	-0,26	0,30	1,00
Temp.	-0,28	-0,56	-0,35
pH	0,46	0,37	-0,08
Cond.	0,60	0,62	0,21
TSS	0,00	-0,20	-0,52
TSD	0,65	0,66	0,15
TOC	0,06	0,30	0,45
TON	0,85	0,70	-0,08
Clorofila	0,77	0,58	-0,12
Fe	-0,08	0,39	0,58
Mn	0,88	0,76	-0,06
Distancia	-0,23	-0,46	-0,46

Tabla 6.14. Matriz de correlaciones de las aguas de enero de 2006 (n=9)

	THg _D	THg _P	Log K _d
THg _D	1,00		
THg _P	0,09	1,00	
Log K _d	-0,27	0,78	1,00
Temp.	-0,01	-0,77	-0,63
pH	0,13	-0,30	-0,09
Cond.	-0,10	0,37	0,23
TSS	0,07	0,75	0,35
TSD	0,19	0,33	0,06
TOC	0,20	0,53	0,06
TON	0,16	0,29	0,27
Clorofila	0,34	0,39	0,24
Fe	0,21	0,84	0,37
Mn	0,27	0,76	0,40
Distancia	0,10	-0,10	0,06

Tabla 6.15. Matriz de correlaciones de las aguas de julio de 2006 (n=9)

	THg _D	THg _P	Log K _d
THg _D	1,00		
THg _P	-0,16	1,00	
Log K _d	-0,90	0,50	1,00
Temp.	0,79	-0,34	-0,81
pH	0,18	0,15	-0,09
Cond.	0,69	-0,27	-0,68
TSS	-0,02	-0,39	0,03
TSD	0,74	-0,21	-0,66
TOC	0,52	-0,27	-0,58
TON	0,50	0,23	-0,22
Clorofila	0,65	-0,05	-0,51
Fe	-0,41	-0,43	0,23
Mn	0,49	-0,29	-0,50
Distancia	-0,50	0,28	0,66

Por otro lado, cabe esperar que cada uno de los tipos de muestras, es decir, las tomadas del río Valdeazogues y las del embalse de La Serena se comporten de manera diferente. Por eso se consideró interesante estudiar las influencias de cada una de ellas por separado a través también de las correspondientes correlaciones.

Los resultados obtenidos (*tablas 6.16 y 6.17*) indican que los contenidos en clorofila *a* influyen sobre las concentraciones de mercurio disuelto en las muestras del río Valdeazogues ($r=0,67$). Sin embargo, en las aguas del embalse de La Serena se observa un comportamiento contrario, puesto que este parámetro no influye sobre el mercurio disuelto sino sobre la fracción particulada ($r=0,67$). Además se aprecian diferencias en cuanto a la influencia del TOC y el TON, cada uno de los cuales es significativo para el mercurio particulado de las aguas del río o el embalse, respectivamente. Por lo tanto, el estado trófico de las aguas parece afectar de manera diferente a cada zona de muestreo.

Tabla 6.16. Matriz de correlaciones de las aguas del río Valdeazogues (n=12)

	THg _D	THg _P	Log K _d
THg _D	1,00		
THg _P	0,28	1,00	
Log K _d	-0,25	0,52	1,00
Temp.	0,57	0,10	0,11
pH	0,42	0,03	0,06
Cond.	0,17	0,37	0,37
TSS	0,25	0,31	0,39
TSD	0,56	0,67	0,29
TOC	0,06	0,61	0,67
TON	0,29	0,39	0,24
Clorofila	0,67	0,47	0,08
Fe	-0,15	0,43	0,51
Mn	-0,13	0,32	0,46
Distancia	0,60	0,45	0,11

Tabla 6.17. Matriz de correlaciones de las aguas del embalse de La Serena (n=16)

	THg _D	THg _P	Log K _d
THg _D	1,00		
THg _P	0,12	1,00	
Log K _d	-0,46	0,64	1,00
Temp.	-0,19	0,29	0,24
pH	0,03	0,62	0,45
Cond.	-0,78	0,09	0,45
TSS	0,19	-0,17	-0,24
TSD	0,05	0,18	0,25
TOC	-0,21	0,28	0,20
TON	-0,08	0,58	0,43
Clorofila	0,06	0,67	0,51
Fe	-0,35	-0,07	0,38
Mn	-0,06	-0,09	-0,10
Distancia	0,09	-0,21	-0,29

Cabe señalar también que en las aguas del río existe una cierta relación entre el mercurio particulado y los sólidos totales disueltos ($r=0,67$) lo que sugiere que las concentraciones de mercurio en la fracción particulada están controladas principalmente por partículas contaminadas con mercurio que han sido erosionadas de las orillas o la propia vertiente del río. Sin embargo, las aguas del embalse presentan bajas correlaciones tanto con los sólidos totales en suspensión como con los sólidos totales disueltos debidas quizá a que en estas aguas estancadas existe una menor corriente. Además destaca por un lado el hecho de que en el embalse de La Serena no existan relaciones significativas entre los contenidos en mercurio y el hierro y el manganeso y por otro el comportamiento contrario para Fe y Mn que se observa en la fracción de mercurio particulada del río y el embalse. Por último, en el embalse de La Serena el mercurio particulado se ve influido por el pH ($r=0,62$) mientras que el mercurio disuelto presenta una gran correlación negativa con la conductividad ($r=-0,78$), tendencia no observada en el río lo que se explica por los valores de conductividad tan distintos que presentan las aguas de ambas zonas de muestreo.

2.2 SEDIMENTOS

Los sedimentos que fueron recogidos en un único muestreo estacional en julio de 2006 en los mismos puntos del río Valdeazogues y del embalse de La Serena que las aguas, fueron también caracterizados analizando ciertos parámetros antes de proceder a la especiación de mercurio.

2.2.1 CARACTERIZACIÓN GENERAL

En primer lugar, se evaluaron una serie de características de las muestras, tales como pH, conductividad y porcentajes en carbono orgánico e inorgánico. Asimismo se determinó la textura de los sedimentos estudiando su composición granulométrica. Por último, se determinó el contenido en algunos metales traza como hierro y manganeso. En todos los casos se emplearon los métodos descritos en el Capítulo II.

Los resultados obtenidos en estas determinaciones se resumen en las *tablas 6.18 y 6.19.*

Tabla 6.18. Características generales de los sedimentos

Punto muestreo	pH	Conductividad ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	C orgánico (%)	C inorgánico (%)
V-1	7,86	81,7	5,76	0,60
V-2	5,05	388,2	4,18	0,40
V-3	6,38	507,2	26,11	1,30
V-4	7,90	179,9	2,93	0,32
S-1	6,40	119,7	1,74	0,47
S-2	7,61	154,6	2,08	0,15
S-3	7,43	116,9	2,34	0,49
S-5	6,80	121,6	3,34	0,63
S-6	7,72	94,5	3,05	0,94

Tabla 6.19. Composición granulométrica y metales traza de los sedimentos

Punto muestreo	Arcilla (%)	Limo (%)	Arena (%)	Fe (mg g ⁻¹)	Mn ($\mu\text{g g}^{-1}$)
V-1	2,2	17,6	80,2	118,8	776,5
V-2	1,6	13,8	84,6	43,2	181,8
V-3	0,7	7,0	92,4	39,1	326,3
V-4	5,0	35,4	59,7	33,5	271,9
S-1	0,9	10,3	88,7	40,3	290,2
S-2	0,9	6,3	92,8	21,5	844,0
S-3	1,2	13,5	85,4	29,5	318,4
S-5	1,0	12,7	86,3	46,8	506,6
S-6	0,8	5,5	93,7	45,6	456,1

La observación de las *tablas 6.18 y 6.19* permite realizar algunas consideraciones:

- El **pH** de las muestras está comprendido entre 5 y 8 por lo que abarca un intervalo muy grande. Estos valores presentan un comportamiento similar al de las aguas, especialmente en el caso de las muestras V-n. Así, los pH mínimo y máximo se corresponden con los puntos V-2 y V-4, respectivamente.
- La **conductividad** presenta valores muy dispares en el caso de las muestras del río Valdeazogues donde oscila entre 82 y 500 $\mu\text{S cm}^{-1}$. Sin embargo, las conductividades de los sedimentos tomados en el embalse de La Serena son más parecidas encontrándose entre los 100-150 $\mu\text{S cm}^{-1}$.
- El porcentaje en **carbono orgánico**, hallado por medio de la determinación de las pérdidas a 500 °C, presenta valores superiores para las muestras del río que para las del embalse, especialmente cabe destacar el punto V-3 cuyo porcentaje del 26 % es muy superior al resto que oscilan entre el 2-6 %.
- En cuanto al porcentaje en **carbono inorgánico**, que es determinado mediante las pérdidas a 900 °C que dan una idea del contenido en carbonatos, todas las muestras presentan valores muy bajos al ser inferiores al 1 %.
- El **ensayo granulométrico** nos muestra que el componente mayoritario de las muestras es, en todos los casos, la arena con porcentajes del 80 a casi el 95 %, mientras que la arcilla es el minoritario con porcentajes que rondan el 1 %, salvo para el punto V-4. En lo que respecta al limo, su contenido es más variable en función de la muestra. Así, basándonos en la clasificación textural americana (USDA) podemos decir que las muestras del embalse de La Serena pueden ser consideradas *arena* (S-1, S-2 y S-6) o *arena franca* (S-3 y S-5) en cuanto a la textura.

Por su parte, dentro de las muestras del río Valdeazogues también encontramos *arenas francas* (V-1 y V-2), una *arena* (V-3) y una muestra de textura *franca arenosa* (V-4).

- Las muestras tomadas del río y del embalse no muestran una tendencia diferenciada en cuanto a los contenidos en **metales traza** como hierro y manganeso ya que presentan concentraciones del mismo orden salvo algunas excepciones. La concentración de hierro encontrada es bastante alta en todos los sedimentos al oscilar entre 20-45 mg g⁻¹, pero lo es anormalmente en el punto V-1 donde está en torno a los 120 mg g⁻¹. En el caso del manganeso, los valores son más dispares, al variar de 180 a 850 µg g⁻¹, siendo los valores máximos los de V-1 y S-2.

Al igual que se hizo en las muestras de agua, todos estos parámetros medidos para caracterizar los sedimentos serán después relacionados con las concentraciones de las diferentes especies de mercurio a través de un estudio estadístico de correlaciones para tratar de explicar los resultados obtenidos.

2.2.2 CONTENIDOS DE MERCURIO TOTAL, MERCURIO EXTRAÍBLE Y MONOMETILMERCURIO

Una vez caracterizados los sedimentos, se procedió a la determinación de mercurio. Debido a que los procesos de metilación y demetilación tienden a producirse en los sedimentos, el análisis del contenido en monometilmercurio en este tipo de muestras juega un papel relevante en los estudios medioambientales de ecosistemas acuáticos. Asimismo, va a ser importante conocer la fracción de mercurio inorgánico disponible porque será la que intervenga principalmente en los procesos de metilación así como la que refleje más fielmente los cambios que se producen en el ciclo biogeoquímico del mercurio debido a las condiciones medioambientales. Esta fracción procedente de la extracción ácida conocida como “mercurio

extraíble” va a depender de las características de cada sedimento ya que está asociada con los carbonatos, los hidróxidos y la materia orgánica (43).

Por lo tanto, no sólo se van a determinar los contenidos totales en mercurio de los sedimentos, sino que dichos análisis serán complementados con otros de especiación. La determinación de monometilmercurio en los sedimentos se llevó a cabo siguiendo el protocolo desarrollado expuesto en el capítulo IV, en el que en función del contenido en mercurio inorgánico extraíble se procederá de una u otra manera. Así pues, como en los sedimentos procedentes del embalse de La Serena la cantidad de Hg^{2+} disponible fue inferior a 500 ng g^{-1} , se realizó directamente el análisis por GC-pyro-AFS, aunque fue necesario preconcentrar las muestras para alcanzar mejores límites de detección. En cuanto a las muestras del río Valdeazogues, al contener valores superiores incluso a 1000 ng g^{-1} , hubo que incorporar una etapa de limpieza o extracción selectiva de especies antes de proceder al análisis, para evitar interferencias cromatográficas o generación artificial de monometilmercurio. Asimismo la determinación del contenido total en mercurio y del mercurio inorgánico extraíble se realizó utilizando para ello los métodos analíticos desarrollados previamente expuestos en los capítulos III y IV.

Los resultados obtenidos en los análisis de mercurio en sedimentos se resumen en la *tabla 6.20* donde se indican las concentraciones de mercurio total, extraíble y monometilmercurio expresadas en $\mu\text{g g}^{-1}$, en peso seco, así como los porcentajes de mercurio inorgánico extraíble y monometilmercurio respecto al contenido total.

Las concentraciones de mercurio total encontradas en los sedimentos presentan importantes diferencias entre las muestras tomadas en el río o el embalse. En los sedimentos del río Valdeazogues se comprueba como los vertidos procedentes de las minas han ejercido una influencia considerable y así se recogen elevadas concentraciones de hasta $74 \mu\text{g g}^{-1}$ en el punto V-3, que también presentó contenidos altos de mercurio en las aguas. Sin embargo, en las muestras procedentes del embalse de La Serena son mucho

menores, pues los puntos correspondientes a la entrada del río Valdeazogues (S-1 a S-3) alcanzan prácticamente los $2 \mu\text{g g}^{-1}$ mientras que los últimos (S-5 y S-6) se encuentran en torno a los $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$.

Tabla 6.20. Resultados análisis de mercurio en sedimentos

Punto muestreo	Hg total ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Hg ²⁺ extraíble ($\mu\text{g g}^{-1}$)	(%)	CH ₃ Hg ⁺ (ng g^{-1})	(%)
V-1	$7,18 \pm 0,11$	$1,20 \pm 0,18$	16,7	$10,20 \pm 1,48$	0,14
V-2	$21,94 \pm 1,22$	$2,37 \pm 0,32$	10,8	$8,58 \pm 0,70$	0,04
V-3	$73,87 \pm 4,34$	$47,30 \pm 1,30$	64,0	$881,3 \pm 24,1$	1,19
V-4	$13,41 \pm 0,87$	$1,43 \pm 0,12$	10,7	$10,93 \pm 0,47$	0,08
S-1	$1,70 \pm 0,17$	$0,302 \pm 0,019$	17,7	$5,95 \pm 1,07$	0,35
S-2	$1,83 \pm 0,23$	$0,306 \pm 0,012$	16,8	$3,79 \pm 0,85$	0,21
S-3	$1,38 \pm 0,26$	$0,313 \pm 0,015$	22,8	$5,71 \pm 0,70$	0,42
S-5	$0,445 \pm 0,013$	$0,131 \pm 0,006$	29,4	$3,39 \pm 0,28$	0,80
S-6	$0,508 \pm 0,039$	$0,069 \pm 0,006$	13,6	$2,42 \pm 0,52$	0,48

(Incertidumbres expresadas como la desviación estándar para tres medidas independientes)

En cuanto al mercurio inorgánico extraíble, las concentraciones no superan los $0,3 \mu\text{g g}^{-1}$ en el embalse de La Serena mientras que en el río Valdeazogues se encuentran entre 1 y $2 \mu\text{g g}^{-1}$, con excepción del punto V-3 donde se alcanzan casi los $50 \mu\text{g g}^{-1}$. Por tanto, los porcentajes oscilan en un amplio intervalo que va aproximadamente del 10 al 30 % salvo en el sedimento V-3 donde es del 64 %.

Por otro lado, en la *figura 6.6* se refleja que tanto los contenidos en mercurio total como los de mercurio inorgánico disponible en los sedimentos guardan una estrecha relación con la distancia a la que se encuentran los puntos de muestreo respecto a Almadén. Como se puede observar, ambas fracciones presentan un comportamiento similar, por lo que cabe esperar que

exista una buena correlación entre los contenidos en mercurio total y mercurio inorgánico extraíble.

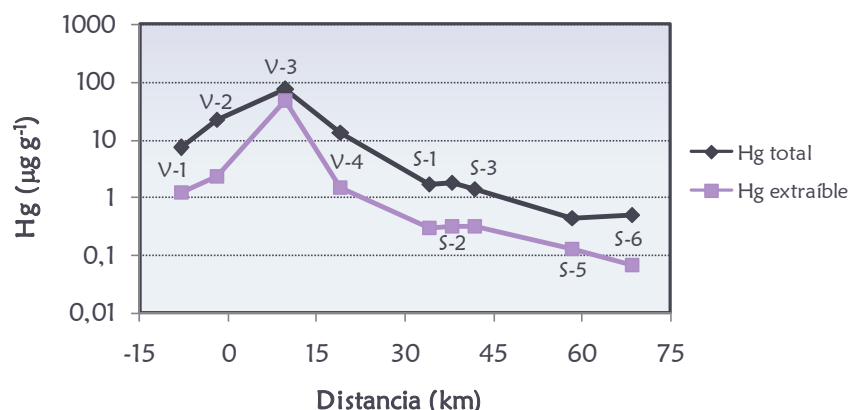


Figura 6.6. Concentraciones de mercurio total y extraíble en los sedimentos frente a la distancia con respecto a Almadén

Dentro de los puntos V-n, el V-1 es el que ofrece un contenido menor de mercurio al encontrarse más alejado aguas arriba de Almadén ya que se produce una disminución del mercurio con la distancia en ambos sentidos. Una vez pasado el punto V-3, que presenta la máxima concentración de mercurio, se observa un importante descenso de las concentraciones. Así, los primeros puntos del embalse de La Serena (S-1, S-2 y S-3) presentan niveles similares y superiores a los últimos puntos debido a que se encuentran en la desembocadura del río Valdeazogues pero al ir adentrándonos en el embalse las concentraciones descienden.

En lo que respecta al monometilmercurio, los resultados obtenidos muestran concentraciones que oscilan entre 2,4 y 10,9 ng g⁻¹, excepto para el punto V-3 donde la concentración es casi dos órdenes de magnitud superior. No obstante, estos contenidos en monometilmercurio sólo exceden el 1 % respecto al mercurio total en el caso de V-3, por lo que se encuentran dentro de los porcentajes inferiores al 1,5 % que son los esperados en sedimentos. Analizando detenidamente los valores reflejados en la *tabla 6.20* cabe

destacar que, sin tener en cuenta el punto V-3, que muestra un comportamiento independiente al verse influido de forma más directa por las actividades mineras, existen importantes diferencias en cuanto a los porcentajes de metilación encontrados en el río Valdeazogues y en el embalse de La Serena. Mientras que el grado de metilación en los sedimentos procedentes del río es muy pequeño (0,05-0,15 %), en las muestras del embalse de La Serena se encuentran porcentajes de metilmercurio superiores que oscilan entre 0,2 y 0,8 %. Además, es importante resaltar que los porcentajes más elevados aparecen en aquellos puntos que se encuentran a una mayor distancia de Almadén por lo que, en principio, deberían estar menos expuestos a la contaminación por mercurio. Todo ello podría estar relacionado con el efecto que tienen las zonas recientemente inundadas, como lo es el embalse de La Serena, en que se produzca un aumento del metilmercurio en el nuevo ecosistema acuático generado debido a que los procesos de metilación microbiana se ven estimulados gracias a los nutrientes introducidos por los nuevos suelos inundados (21).

De nuevo podemos comparar los resultados obtenidos con los valores considerados “normales” o “fondo” para el mercurio total y el metilmercurio en otros estudios de ecosistemas acuáticos que pueden considerarse no contaminados (54) o que están expuestos también a la contaminación por mercurio (59), así como con los niveles control de un estudio anterior realizado en la Comarca de Almadén (5) (*tabla 6.21*), tal y como se hizo para las muestras de agua.

Tabla 6.21. Niveles control de mercurio y metilmercurio en sedimentos

Localización	Hg total ($\mu\text{g g}^{-1}$)	CH_3Hg^+ (ng g^{-1})
Lago Baikal en Rusia (54)	0,005-0,072	---
Río Truckee, Nevada (59)	0,02-0,28	---
Control próximo a Almadén (5)	0,36-0,60	0,23-4,3

En la *figura 6.7*, donde se representan las concentraciones de mercurio total y metilmercurio encontradas en los sedimentos del río Valdezogues y del embalse de La Serena, todas las relaciones vuelven a quedar fuera del valor límite establecido teniendo en cuenta únicamente los valores control para el mercurio total en otras zonas no contaminadas o menos expuestas a la contaminación por mercurio reflejados en la *tabla 6.21*. Sin embargo, al considerar los valores de fondo encontrados en un trabajo previo de la zona de Almadén (5), las dos muestras del embalse de La Serena que se encuentran más alejadas de la entrada del río Valdezogues (S-5 y S-6) quedan dentro del área delimitada por estos valores. Además se observa que el resto de los puntos del embalse se encuentran muy próximos al límite establecido en cuanto al metilmercurio ($4,3 \text{ ng g}^{-1}$) por lo que sólo podrían considerarse contaminadas en cuanto a su contenido de mercurio total. Por su parte, los sedimentos del río Valdezogues quedan fuera de ambos límites al presentar concentraciones bastante superiores a los valores control, por lo que podrían considerarse como muestras contaminadas, especialmente en el caso del punto V-3, que se encuentra muy alejado del resto de puntos en cuanto a ambas concentraciones.

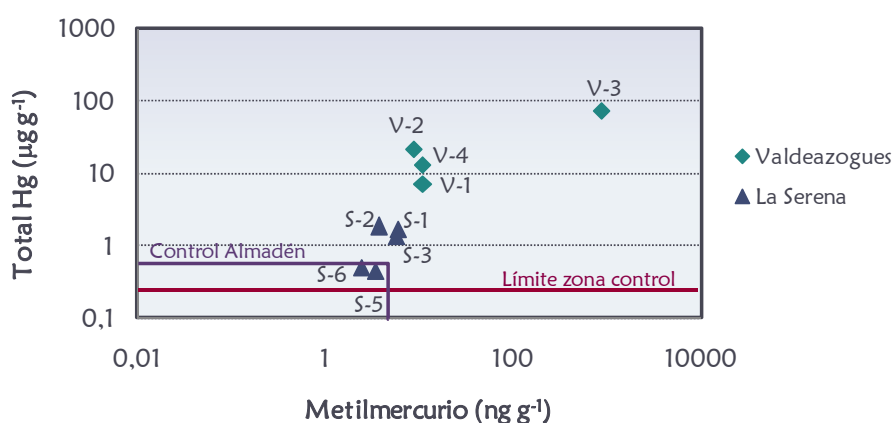


Figura 6.7. Concentración de mercurio total frente a la concentración de metilmercurio en los sedimentos tomados en la Comarca de Almadén

2.2.3 RELACIONES ENTRE EL MERCURIO Y OTROS FACTORES MEDIOAMBIENTALES

Para tratar de evaluar cuáles son los factores que controlan la distribución de las especies de mercurio en los sedimentos de la zona estudiada se van a buscar las relaciones que existen entre los distintos parámetros conocidos de las muestras. Para ello se procedió de igual manera que con las aguas, es decir, realizando un estudio estadístico con correlaciones y calculando el correspondiente coeficiente de correlación de Pearson (r) para un nivel de significación del 5 % ($p < 0,05$). En principio estudiaremos conjuntamente los sedimentos del río Valdeazogues y del embalse de La Serena para ver cuáles son las tendencias que se cumplen para ambos tipos de muestras pero, a continuación, analizaremos también por separado la influencia que ejercen los diferentes factores en cada uno de los dos tipos de sedimentos.

Como se muestra en la *tabla 6.22* que se corresponde con la matriz de correlaciones considerando todas las muestras, en el caso de los sedimentos existen muchas relaciones estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las características físico-químicas y medioambientales y los contenidos en mercurio. En primer lugar, cabe indicar que las diferentes formas de mercurio analizadas (mercurio total, mercurio inorgánico extraíble y monometilmercurio) están fuertemente correlacionadas entre sí (r oscila de 0,95 a 1,00), como era de esperar por las similitudes encontradas en los perfiles de distribución de las especies representados en la *figura 6.7*. Otra importante correlación la presentan los porcentajes de mercurio inorgánico extraíble y de monometilmercurio ($r = 0,91$), lo que indica que en los sedimentos juega un papel más importante la fracción de mercurio inorgánico disponible que el mercurio total contenido en ellos. Por otro lado, el factor que ejerce una influencia más destacada en las tres formas de mercurio es el porcentaje en carbono orgánico con r muy próximos a 1,0 en todos los casos. Por último, también existen correlaciones significativas, pero en menor grado, con la conductividad y el porcentaje en carbonatos.

Tabla 6.22. Matriz de correlaciones de los sedimentos de julio de 2006 (n=9)

	Hg total	Hg _{extraíble}	CH ₃ Hg ⁺	%Hg _{extraíble}	%CH ₃ Hg ⁺
Hg total	1,00				
Hg _{extraíble}	0,97	1,00			
CH ₃ Hg ⁺	0,95	1,00	1,00		
%Hg _{extraíble}	0,82	0,92	0,93	1,00	
%CH ₃ Hg ⁺	0,60	0,75	0,77	0,91	1,00
pH	-0,40	-0,27	-0,25	-0,21	-0,14
Cond.	0,91	0,81	0,79	0,63	0,41
%C _{orgánico}	0,96	0,99	0,99	0,92	0,74
%C _{inorgánico}	0,67	0,76	0,77	0,76	0,81
Arcilla	-0,07	-0,22	-0,24	-0,39	-0,51
Limo	-0,10	-0,25	-0,26	-0,36	-0,47
Arena	0,10	0,25	0,26	0,37	0,48
Fe	-0,07	-0,09	-0,09	-0,09	-0,17
Mn	-0,31	-0,20	-0,19	-0,10	-0,11
Distancia	-0,48	-0,31	-0,28	-0,09	0,28

No obstante, es probable que algunas de las buenas correlaciones encontradas con algunos parámetros no se deban realmente a que las muestras tengan en general esa tendencia sino a que el punto V-3 que presenta un comportamiento muy diferente al resto de las muestras sea el responsable de que se establezca una linealidad “ficticia”. Por este motivo, se estudiaron gráficamente las relaciones existentes entre las especies de mercurio y los distintos parámetros analizados. Los gráficos de dispersión obtenidos mostraron que, especialmente en los casos de los parámetros que muestran mejores correlaciones con las distintas especies de mercurio, las relaciones obtenidas son debidas a un artificio matemático provocado por el punto V-3. Así, a modo de ejemplo, en la *figura 6.8* se puede comprobar que los altos valores de r encontrados en las correlaciones con el carbono orgánico no se deben a una distribución de las muestras en ese sentido sino al punto V-3 que al presentar valores muy distintos al resto altera el resultado de la correlación. Por tanto, para conocer realmente los efectos que ejercen las diferentes variables estudiadas sobre los contenidos en mercurio va a ser necesario realizar el estudio de correlaciones sin tener en cuenta el punto V-3 pues, en algunos casos, puede que esta muestra altere las tendencias.

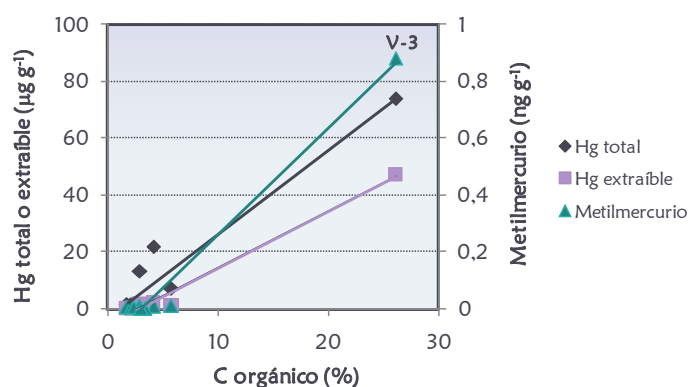


Figura 6.8. Gráfico de dispersión que muestra las tendencias entre las especies de mercurio y el porcentaje en carbono orgánico.

Al analizar los resultados de las nuevas correlaciones realizadas eliminando el punto V-3 (*tabla 6.23*) se observan importantes diferencias respecto a lo encontrado en la *tabla 6.22*, ya que existen menos correlaciones significativas y además hay parámetros que exhiben tendencias contrarias.

Tabla 6.23. Matriz de correlaciones de los sedimentos excepto V-3 ($n=8$)

	Hg total	Hg _{extraíble}	CH ₃ Hg ⁺	%Hg _{extraíble}	%CH ₃ Hg ⁺
Hg total	1,00				
Hg _{extraíble}	0,99	1,00			
CH ₃ Hg ⁺	0,71	0,79	1,00		
%Hg _{extraíble}	-0,65	-0,63	-0,48	1,00	
%CH ₃ Hg ⁺	-0,73	-0,76	-0,75	0,84	1,00
pH	-0,52	-0,48	-0,02	0,07	0,09
Cond.	0,86	0,81	0,31	-0,47	-0,51
%C _{orgánico}	0,45	0,55	0,57	-0,15	-0,28
%C _{inorgánico}	-0,34	-0,33	-0,32	0,18	0,54
Arcilla	0,53	0,53	0,76	-0,47	-0,53
Limo	0,51	0,51	0,77	-0,31	-0,42
Arena	-0,52	-0,52	-0,78	0,33	0,44
Fe	0,09	0,23	0,50	-0,01	-0,15
Mn	-0,44	-0,35	-0,17	0,22	0,06
Distancia	-0,75	-0,84	-0,90	0,48	0,81

De nuevo existe una buena correlación entre los contenidos en mercurio total y la fracción de mercurio disponible ($r=0,99$) pero, sin embargo, la relación que ambas fracciones tienen con el metilmercurio es más débil con r de 0,71 y 0,79, respectivamente. Además cabe destacar que tanto los porcentajes de metilmercurio como los de mercurio extraíble correlacionan de forma negativa con las concentraciones de mercurio por lo que pese a este comportamiento diferente, ambos porcentajes siguen estando relacionados ($r=0,84$). La conductividad sigue siendo la única variable que presenta correlaciones significativas con el mercurio total ($r=0,86$) y el mercurio extraíble ($r=0,81$) ya que los porcentajes de carbono inorgánico y orgánico muestran ahora una tendencia diferente. Así, al no considerar el punto V-3, el porcentaje en carbonatos pasa a presentar una relación negativa y poco significativa con los contenidos en mercurio. Por otro lado, entre el carbono orgánico y las especies de mercurio siguen existiendo relaciones positivas si bien ahora no son significativas. Esta falta de correlación entre el mercurio y el carbono orgánico ha sido encontrada también en otros estudios (60-63), generalmente en sedimentos con bajos contenidos de carbono orgánico como son las muestras tomadas del embalse de La Serena y el río Valdeazogues. No obstante, el metilmercurio es el mejor correlacionado con el carbono orgánico con un $r=0,57$ que puede explicar los efectos opuestos que parece tener el carbono orgánico sobre los procesos de metilación. Aunque aún no se ha podido justificar el verdadero efecto que tiene la materia orgánica en la biodisponibilidad y metilación del mercurio inorgánico parece que juega un destacado papel en estos procesos (64). Por un lado, el carbono orgánico induce la metilación estimulando la actividad de microorganismos heterotróficos o bien a través de las sustancias húmicas o fúlvicas. Sin embargo, por otro lado, parece que la metilación se ve inhibida a altas concentraciones de carbono orgánico disuelto debido al aumento de la complejación del mercurio con los ligandos orgánicos, reduciéndose la disponibilidad del mercurio hacia las bacterias, particularmente a pH neutros (65). Por lo tanto, en función de las características del medio el carbono orgánico tendrá una influencia diferente como se observa en nuestro caso.

Al no existir una fuerte asociación del mercurio con la materia orgánica, cabría esperar que este metal estuviera unido a otras fases de la matriz sedimentaria como pueden ser los hidróxidos de Fe y Mn o los iones sulfuro (66-69). Sin embargo, esta relación no siempre se ha comprobado en los estudios realizados en sedimentos (47, 70, 71). En nuestro caso, los resultados obtenidos (*tabla 6.23*) no indicaron correlaciones significativas entre el mercurio y el hierro o el manganeso, que además presentan un comportamiento contrario en cuanto al signo de las relaciones encontradas (las relaciones Hg-Mn son negativas mientras que las Hg-Fe son positivas). No obstante, el metilmercurio presenta una cierta relación con el hierro ($r=0,50$) del mismo orden que la que presentaba con el carbono orgánico. Este hecho puede comprobarse en la representación triangular de las concentraciones de metilmercurio, hierro y carbono orgánico (*figura 6.9*).

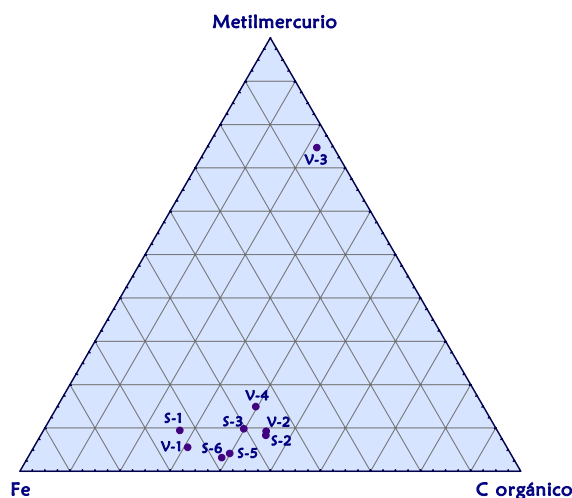


Figura 6.9. Representación triangular del metilmercurio, hierro y la materia orgánica presentes en los sedimentos analizados

En la *figura 6.9* se observa que, en general, el metilmercurio no está desplazado claramente hacia ninguno de los otros dos vértices del triángulo lo que indica que parte del metilmercurio se encontrará asociado a la materia orgánica mientras que otra fracción estará ligada a los hidróxidos de hierro.

Sin embargo, el punto V-3 presenta de nuevo un comportamiento independiente al encontrarse totalmente desplazado hacia el carbono orgánico.

Por último, analizando la *tabla 6.23* también se aprecia que, al despreciar el punto V-3, aparecen buenas correlaciones negativas de las especies de mercurio con la distancia, tal y como cabía esperar según lo observado en la *figura 6.6*. Asimismo, en cuanto a la granulometría de los sedimentos, destaca el hecho de que las especies de mercurio correlacionen positivamente con la arcilla y el limo, que son los componentes minoritarios de los sedimentos, pero lo hagan de forma negativa con el contenido de arena, lo cual indica que en las fracciones más finas la concentración de mercurio es proporcional al tamaño mientras que en las partículas de mayor diámetro ($> 50 \mu\text{m}$) es inversamente proporcional.

Tras estudiar conjuntamente el efecto que tienen distintas variables en los contenidos en mercurio de los sedimentos se evaluaron también las muestras del río y del embalse por separado. Las correlaciones de los sedimentos del río Valdeazogues podrían realizarse utilizando los cuatro puntos de muestreo pero, en ese caso, algunas de las relaciones observadas serían debidas al efecto que produce el punto V-3, por lo que para corregir dicho efecto el cálculo se realizó despreciando ese valor. Al estudiar las muestras del río Valdeazogues sin considerar el punto V-3 no se obtienen correlaciones estadísticamente significativas para $p < 0,05$, lo cual se debe probablemente al bajo número de muestras ($n=3$). No obstante, en general las tendencias que presentan estos valores son similares a las encontradas al analizar todas las muestras conjuntamente pues el mercurio total correlaciona bien con el mercurio extraíble ($r=0,97$), los porcentajes de mercurio disponible y metilmercurio correlacionan entre sí ($r=0,91$) y de manera negativa con las concentraciones de mercurio total y extraíble. Asimismo existe una importante influencia de la conductividad en los contenidos en mercurio total y extraíble ($r=0,99$). Sin embargo, aparecen también comportamientos diferentes ya que el metilmercurio correlaciona de forma negativa con el mercurio total y extraíble, presentando también una

importante correlación con el pH ($r=1,0$) y una influencia negativa de la conductividad ($r=-0,97$). Por otro lado, el carbono orgánico apenas influye sobre el mercurio, ni siquiera en el metilmercurio, mientras que la relación del hierro en dicha especie sigue siendo del mismo orden ($r=0,48$), aunque aparece una nueva relación con el manganeso ($r=0,68$). No obstante, estos dos metales presentan buenas correlaciones negativas con los contenidos de mercurio total y extraíble. Cabe también destacar que en los sedimentos del río los contenidos de limo y arcilla siguen correlacionando positivamente y la arena de forma negativa con el metilmercurio, pero dichas tendencias son del signo contrario para mercurio total y extraíble.

En cuanto a las muestras tomadas del embalse de La Serena su comportamiento es, en general, diferente a las del río Valdeazogues. El análisis de las correlaciones vuelve a mostrar una buena relación entre el mercurio total y la fracción extraíble ($r=0,94$) pero las correlaciones de ambos con el metilmercurio son, en esta ocasión, positivas. Además el pH no juega un papel tan importante sobre el metilmercurio y de igual manera se pierden las relaciones de los contenidos de mercurio con la conductividad observadas en las muestras del río. Uno de los parámetros que presenta una correlación destacada es el porcentaje en carbono orgánico que correlaciona con el mercurio total de forma negativa ($r=-0,96$). Este hecho confirma las afirmaciones de Ullrich *et al.* (65) en referencia a la ambigüedad de su influencia. Así pues, aunque generalmente se observan correlaciones positivas entre los contenidos en mercurio y el porcentaje en carbono orgánico (46, 72-75), que indican que la materia orgánica va a tener una gran afinidad por formar enlaces con el mercurio, en los sedimentos del embalse de La Serena este parámetro presenta un comportamiento contrario. Otro factor que parece ejercer un efecto en los contenidos de mercurio de estas muestras es la distancia kilométrica a la que se sitúan los puntos de muestreo respecto de Almadén pues presenta correlaciones significativas con el mercurio total ($r=-0,95$) y el mercurio inorgánico ($r=-0,97$). Estas relaciones son negativas porque, como ya se observó en la correspondiente representación gráfica (*figura 6.6*), las concentraciones de mercurio más altas se obtuvieron en los puntos más cercanos a Almadén situados en la zona de entrada del río

Valdezogues. Sin embargo, cabe resaltar que la tendencia es contraria en cuanto a los porcentajes de mercurio extraíble y metilmercurio que aumentan con la distancia. Por último, se observa que los sedimentos del embalse no presentan las mismas relaciones entre el metilmercurio y el hierro y el manganeso que existían en el río pues, en este caso, se obtienen pobres correlaciones y de signo negativo con estos metales.

2.3 BIOTA

Para completar el estudio de contaminación por mercurio en la Comarca de Almadén se consideró de gran interés realizar una aproximación a los niveles de mercurio en la biota de la zona ya que tanto el monometilmercurio como, en menor medida, el mercurio inorgánico tienden a ser acumulados en la biota, especialmente en los peces y moluscos. Para ello se analizaron, en primer lugar, peces del río Valdezogues ya que el consumo de pescado parece suponer la principal fuente de exposición por la dieta a metilmercurio (76). Asimismo se consideró que una especie autóctona de bivalvos encontrados en el embalse de La Serena podría servir como organismo indicador de los niveles de mercurio en la componente biológica del ecosistema estudiado puesto que, al encontrarse dichos organismos semienterrados en los sedimentos, la transferencia de mercurio desde los sedimentos podría ser significativa. La especiación de mercurio en peces y bivalvos se llevó a cabo siguiendo el método para muestras biológicas desarrollado en el capítulo IV.

2.3.1 ESPECIACIÓN DE MERCURIO EN PECES DEL RÍO VALDEAZOGUES

Los peces analizados se tomaron en el punto V-4 en septiembre de 2005 y correspondían a dos especies diferentes de la familia Centrarchidae: *Lepomis gibbosus* (percasol o pez sol) y *Micropterus salmoides* (black bass o perca americana). Según la bibliografía las características generales de ambas especies son las que se describen a continuación:

- PERCASOL: Suele presentar un peso máximo de 400 g y una longitud máxima de 25 cm. Habita lagunas y tramos de ríos con escasa profundidad, corriente lenta y densa vegetación acuática. Soporta bien la falta de oxígeno y las altas temperaturas. Son voraces depredadores de invertebrados, huevos y pequeños peces. Está considerada como una gran amenaza para las especies autóctonas por lo que en ciertas Comunidades Autónomas se obliga al sacrificio de los ejemplares pescados.
- BLACK BASS: Esta especie puede alcanzar un peso máximo de hasta 4 kg y una longitud de 45 cm debido a que puede vivir incluso 9 ó 10 años. Los black bass son peces sedentarios que muestran preferencia por aguas relativamente cálidas, con vegetación abundante y escasa corriente. Tiene una dieta compuesta por invertebrados, anfibios y peces, más ictiófaga a medida que alcanza tamaños mayores.

2.3.1.1 Análisis biométrico de los peces

El número de individuos recogidos de cada especie así como la codificación empleada para la identificación de las muestras se indica en la *tabla 6.24*.

Tabla 6.24. Individuos de cada especie de pez y su codificación

Especie	Número de individuos	Código
Percasol	10	P1-P10
Black bass	5	BL1-BL5

Tras la toma de muestra, se determinaron una serie de parámetros biométricos de los peces, como el peso y la longitud estándar, furcal y total, antes de proceder a extraer el tejido a analizar (*tabla 6.25*).

Tabla 6.25. Datos biométricos de los peces del río Valdeazogues

	Muestra	Peso (g)	Longitud (mm)			IEN
			Estándar	Furcal	Total	
PERCASOL	P1	47,1	112	128	135	3,35
	P2	19,5	75	85	99	4,62
	P3	20,9	86	102	111	3,29
	P4	16,8	85	94	105	2,74
	P5	12,1	73	84	89	3,11
	P6	10,0	70	81	87	2,92
	P7	11,9	74	86	91	2,94
	P8	16,2	78	87	97	3,41
	P9	16,0	79	90	98	3,25
	P10	10,1	67	73	---	3,36
	MEDIA	18,1	79,9	91,0	101,3	3,30
	SD	10,9	12,8	15,1	14,7	0,52
BLACK BASS	BL1	135,2	185	198	204	3,35
	BL2	44,6	126	141	150	4,62
	BL3	102,8	175	200	207	3,29
	BL4	34,8	118	133	142	2,74
	BL5	31,1	115	130	136	3,11
	MEDIA	41,97	103,57	115,81	127,79	2,09
	SD	42,77	51,61	56,83	59,33	0,12

Los valores obtenidos para los parámetros biométricos de los peces permitieron calcular el índice de estado nutricional de los peces (IEN) según la definición propuesta por Cizdziel *et al.* (77):

$$IEN = \frac{\text{Peso del pez (g)}}{(\text{Longitud estándar del pez (mm)})^3} \times 100.000$$

Este índice permite evaluar el estado nutricional del pez, así cuando su valor es igual o inferior a 0,8 esto nos indica un estado de desnutrición mientras que valores superiores a 1,0 representan un buen estado de nutrición. Además, el cálculo del IEN se consideró interesante ya que otros autores han observado relaciones entre este parámetro y la carga en mercurio del pez (77), por lo que una vez determinadas las diferentes especies de mercurio se tratarán de relacionar estos resultados tanto con este índice como con el peso y la longitud de los peces.

Como se puede observar en la *tabla 6.25*, en nuestro caso, los valores del IEN fueron superiores a 2,0, excepto para uno de los peces black bass. Por lo tanto, podemos afirmar que todos estos peces presentaban un buen estado nutricional. Del análisis biométrico realizado cabe resaltar también que los valores de peso y longitud media encontrados en los peces muestreados distan mucho de los valores máximos indicados anteriormente para cada una de las especies (400 g para los percasol y 4 kg para los black bass) pues el percasol mayor pesa únicamente 47 g mientras que los dos black bass más grandes no alcanzan ni los 150 g. Por tanto, los peces analizados son muy pequeños dentro de su especie lo que podrá tener una cierta influencia en los contenidos de mercurio.

2.3.1.2 Contenidos de mercurio

A pesar del buen estado nutricional de los peces tomados, sus órganos eran, en general, muy pequeños por lo que se decidió analizar únicamente el músculo, al ser el tejido donde reside la mayor parte del mercurio en forma neurotóxica, es decir, como monometilmercurio y además porque el músculo de los peces es la principal ruta de exposición humana a dicha especie de mercurio (78, 79). El músculo, una vez extraído, fue tratado tal y como indicó en el capítulo II para finalmente determinar su contenido en monometilmercurio y mercurio inorgánico, según el método de especiación desarrollado en el capítulo IV.

Los resultados obtenidos en los análisis de especiación de mercurio realizados se muestran en la *tabla 6.26*, donde aparecen las concentraciones de monometilmercurio y mercurio inorgánico, así como la carga total en mercurio calculada como suma de ambas especies y el porcentaje en monometilmercurio.

Tabla 6.26. Contenidos de mercurio en peces del río Valdeazogues

	Muestra	CH ₃ Hg ⁺ (ng g ⁻¹)	Hg ²⁺ (ng g ⁻¹)	Hg total (ng g ⁻¹)	CH ₃ Hg ⁺ (%)
PERCASOL	P1	40,7	2,3	42,9	94,7
	P2	4,2	<LD	4,2	100
	P3	12,0	<LD	12,0	100
	P4	15,7	<LD	15,7	100
	P5	15,9	<LD	15,9	100
	P6	10,2	<LD	10,2	100
	P7	4,3	<LD	4,3	100
	P8	6,7	<LD	6,7	100
	P9	4,3	<LD	4,3	100
	P10	6,5	<LD	6,5	100
	MEDIA	12,0	<LD	12,3	99,5
	SD	11,0	---	11,7	1,7
BLACK BASS	BL1	26,5	5,4	31,9	82,9
	BL2	6,9	2,2	9,0	76,1
	BL3	20,7	6,7	27,3	75,6
	BL4	14,6	6,2	20,8	70,1
	BL5	12,0	3,5	15,5	77,2
	MEDIA	16,1	4,8	20,9	76,4
	SD	7,6	1,9	9,1	4,6

(LD: límite de detección)

Como se puede observar en la *tabla 6.26*, las concentraciones de mercurio total encontradas están muy por debajo del límite de 2500 ng g⁻¹ (en peso seco) establecido por la Organización Mundial de la Salud (80), al oscilar entre 4 y 43 ng g⁻¹. Estos contenidos en mercurio son anormalmente bajos ya que cabía esperar que al provenir del río Valdeazogues presentaran una carga en mercurio muy superior. Este hecho puede quizá ser explicado por el pequeño tamaño de estas muestras que son mucho menores que los individuos característicos de cada una de las especies. Algunos estudios han indicado que a medida que aumenta la edad del pez, que está directamente relacionada con su tamaño (peso o longitud), la concentración de mercurio en sus tejidos es mayor puesto que el tiempo de exposición en peces adultos es mayor que en peces jóvenes (81-89). Por tanto, puede que nuestros peces no hayan estado un tiempo suficiente en el ecosistema acuático estudiado como para acumular una concentración significativa de mercurio. Sin embargo, la mayor parte del mercurio se encuentra en forma de metilmercurio. Así, en los black bass ronda el 75 % mientras que en los peces de la especie percasol es prácticamente del 100 % en todos los casos ya que la concentración de mercurio inorgánico no fue detectable para esta especie. Este predominio se explica por una absorción más eficaz del metilmercurio existente en el agua y en los alimentos, con respecto al mercurio inorgánico.

2.3.1.3 Relaciones entre el mercurio y los parámetros biométricos del pez

Para evaluar las relaciones entre parámetros como el peso, la longitud o el índice de estado nutricional del pez con su contenido en mercurio se llevaron a cabo tratamientos estadísticos de correlaciones de manera que estableciendo de nuevo un valor de significación del 5 %, todas las correlaciones que ofrezcan un valor de $p < 0,05$ pueden considerarse significativas. Los resultados obtenidos se resumen en las *tablas 6.27 y 6.28*, donde se presentan las matrices de correlaciones para ambas especies de pez.

Tabla 6.27. Matriz de correlaciones de los peces de la especie percasol ($n=10$)

	Hg total	CH ₃ Hg ⁺	%CH ₃ Hg ⁺	Peso	Longitud	IEN
Hg total	1,00					
CH ₃ Hg ⁺	1,00	1,00				
%CH ₃ Hg ⁺	-0,92	-0,91	1,00			
Peso	0,87	0,86	-0,94	1,00		
Longitud	0,88	0,87	-0,88	0,96	1,00	
IEN	-0,16	-0,17	-0,03	0,20	-0,03	1,00

Tabla 6.28. Matriz de correlaciones de los peces de la especie black bass ($n=5$)

	Hg total	Hg ²⁺	CH ₃ Hg ⁺	%CH ₃ Hg ⁺	Peso	Longitud	IEN
Hg total	1,00						
Hg ²⁺	0,82	1,00					
CH ₃ Hg ⁺	0,99	0,73	1,00				
%CH ₃ Hg ⁺	0,40	-0,19	0,52	1,00			
Peso	0,85	0,48	0,89	0,70	1,00		
Longitud	0,84	0,52	0,87	0,63	0,99	1,00	
IEN	-0,46	-0,62	-0,39	0,09	-0,23	-0,32	1,00

Debido a que en los peces percasol las concentraciones de mercurio inorgánico estuvieron por debajo de los límites de detección, este contenido no se ha incluido en el estudio de correlaciones de estos peces (tabla 6.27). Como se puede deducir de los resultados anteriores, en ambas especies existen buenas correlaciones (r próximos a 0,9) entre los parámetros de tamaño (peso y longitud) y el contenido en monometilmercurio, lo que indica que a mayor tamaño mayor es la acumulación de dicha forma de mercurio en el tejido muscular del pez. Aunque ambos parámetros biométricos (peso y longitud) están también correlacionados entre sí con r próximos a 1,0, en general, existe una mejor correlación de los contenidos de mercurio con el peso que con la longitud. Por su parte, en los peces black bass sólo son significativas las correlaciones del metilmercurio con el mercurio total ($r=0,99$) y el peso ($r=0,89$). No obstante, existen otras relaciones que presentan también r altos por lo que el hecho de no ser significativas se justifica por el menor número de muestras estudiado en este caso.

Atendiendo a todo lo anterior, el peso es el parámetro biométrico que presenta una mejor correlación con los contenidos de monometilmercurio. En la *figura 6.10*, donde se representan la concentración de metilmercurio y el peso de los peces mediante el correspondiente gráfico de dispersión, se comprueba la buena correlación existente entre ambas variables. Además se observa que los peces de la especie percasol presentan una correlación con una pendiente mucho más pronunciada lo que puede deberse a que el tiempo que tarda un black bass en alcanzar un peso de 50 g es mucho menor que el de un percasol.

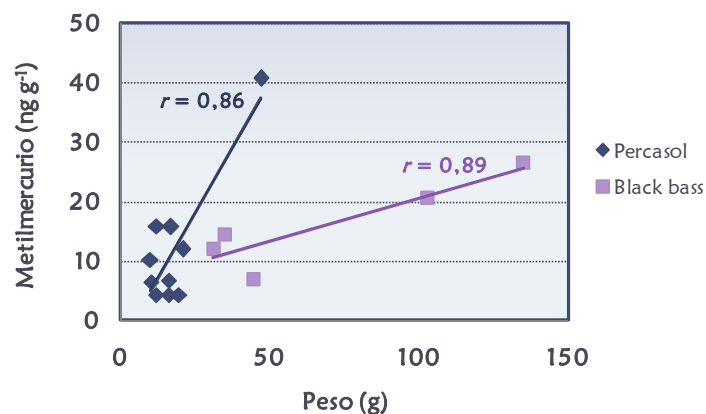


Figura 6.10. Gráfico de dispersión que muestra la relación entre los contenidos en metilmercurio y el peso de los peces

Debido a que tanto la carga en mercurio como los tamaños de ambos tipos de peces no fueron muy dispares, se consideró interesante realizar un análisis de varianzas o contraste de muestras para discernir si existían diferencias en el comportamiento de ambas especies respecto a las distintas variables estudiadas, es decir, los parámetros biométricos del pez y los contenidos en mercurio. Para realizar este tipo de análisis hay que evitar que exista otra variable que afecte de manera significativa a los resultados. Por tanto, como previamente se había comprobado la influencia que tenía el peso en los contenidos de mercurio, se procedió a la corrección de los

valores de carga en mercurio dividiéndolos por el peso del pez (en g). Por otro lado, debido a que el tamaño de muestra era bajo se decidió aplicar un test no paramétrico, en base a lo indicado en el capítulo II. Así pues, para evaluar el efecto de la especie de pez sobre el resto de variables se aplicó el test de la U de Mann-Whitney, de manera que aquellas variables que ofrecieran valores de $p < 0,05$ no presentarían diferencias estadísticamente significativas en función de la especie.

Los resultados obtenidos al aplicar dicho test estadístico indicaron que tanto el peso ($p=0,007$) como la longitud ($p=0,002$) eran variables independientes de la especie. Sin embargo, los valores del IEN sí se veían influidos por el tipo de pez al presentar un contraste estadísticamente significativo ($p=0,95$). Asimismo las concentraciones de monometilmercurio ($p=0,16$) y de mercurio total ($p=0,08$) sin corregir muestran diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, este hecho no se debe a que las especies presenten un comportamiento diferente en cuanto a la bioacumulación del mercurio sino al efecto que tiene el tamaño en los contenidos de mercurio, ya que en las concentraciones corregidas por el peso se obtienen contrastes no significativos ($p=0,008$ y $p=0,004$ para el monometilmercurio y el mercurio total, respectivamente). Todo ello indica que, en los individuos muestreados, la especie no ejerce un efecto ni sobre el tamaño ni sobre los contenidos en mercurio.

En resumen, todos estos resultados indican la existencia de una clara relación positiva y directa entre el tamaño del pez y la carga en mercurio pero, sin embargo, no se ha observado ninguna relación entre el índice de estado nutricional y el contenido en mercurio. Cizdziel *et al.* (77, 90) encontraron una relación logarítmica inversa entre estas variables y, por este motivo, afirmaron que la falta de alimentación hace que los niveles de mercurio en los peces aumenten. Sin embargo, en nuestro caso, la representación gráfica del logaritmo de la concentración en mercurio frente al IEN (*figura 6.11*) no presenta tendencias claras para ninguna de las especies por lo que no parece existir ninguna relación entre el índice de estado nutricional y el mercurio acumulado. Quizá esto se deba al hecho de que las

concentraciones de mercurio encontradas son muy bajas por lo que no han ejercido influencia alguna sobre el estado nutricional del pez como lo demuestran los altos índices nutricionales encontrados que son muy superiores a 1,0, donde se establece la barrera con la desnutrición.

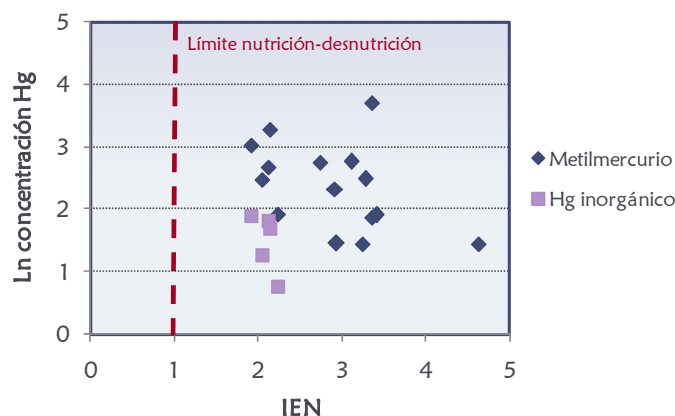


Figura 6.11. Gráfico de dispersión que muestra el efecto del IEN sobre la carga en mercurio

2.3.1.4 Factores de bioacumulación

Investigaciones previas han indicado que la bioacumulación del metilmercurio en los organismos acuáticos puede verse afectada por variaciones en la química del ambiente (91). Por este motivo, a pesar de que las concentraciones de mercurio encontradas en los peces de ambas especies no son excesivamente elevadas, vamos a tratar de evaluar la interacción existente entre los distintos compartimentos acuáticos (aguas, sedimentos y biota) a través de los correspondientes factores de bioacumulación (BAF). Estos factores relacionan las concentraciones de metilmercurio de los peces con los contenidos de metilmercurio encontrados en las aguas (BAF_{agua}) y los sedimentos ($BAF_{\text{sedimento}}$) en las que habitaban y van a venir definidos por las siguientes expresiones (19, 91):

$$BAF_{agua} = \frac{\text{Concentración de metilmercurio en el pez (ng g}^{-1}\text{)}}{\text{Concentración de metilmercurio en el agua (ng mL}^{-1}\text{)}}$$

$$BAF_{sedimento} = \frac{\text{Concentración de metilmercurio en el pez (ng g}^{-1}\text{)}}{\text{Concentración de metilmercurio en el sedimento (ng g}^{-1}\text{)}}$$

Los valores obtenidos para los factores de bioacumulación de metilmercurio de los peces de ambas especies expresados en forma de logaritmo de BAF se resumen en la *tabla 6.29*.

Tabla 6.29. Logaritmos de los factores de bioacumulación de metilmercurio para agua y sedimento en los peces analizados

	PERCASOL		BLACK BASS	
	log BAF _{agua}	log BAF _{sedimento}	log BAF _{agua}	log BAF _{sedimento}
Valor mínimo	3,61	-0,41	3,82	-0,20
Valor máximo	4,59	0,57	4,40	0,38
Media	3,94	-0,08	4,15	0,12
SD	0,32	0,32	0,23	0,23

Como se observa en la *tabla 6.29*, los factores de bioacumulación más altos son los correspondientes a la relación entre los contenidos de metilmercurio del pez y el agua que son del orden de 10^4 , lo que indica que las concentraciones de metilmercurio encontradas en el tejido muscular de los peces son del orden de 10.000 veces mayores que las encontradas en las aguas de la zona del río Valdeazogues donde fueron tomados los peces. Sin embargo, la bioacumulación experimentada por el metilmercurio es mucho menor si comparamos los niveles de metilmercurio con los de los correspondientes sedimentos lo que indica la escasa interacción que existe entre estos organismos acuáticos y los sedimentos. Asimismo cabe señalar que

los valores medios de los BAF fueron superiores en los peces black bass tanto para aguas como para sedimentos aunque los valores más extremos se encontraron en los percasol.

2.3.2 ESPECIACIÓN DE MERCURIO EN BIVALVOS DEL EMBALSE DE LA SERENA

La especiación de mercurio en bivalvos se llevó a cabo de manera similar a la de los peces, con la intención de que este organismo sirviera para realizar una aproximación de la interacción entre los compartimentos del ecosistema acuático estudiado. Como los diferentes individuos recogidos presentaban tamaños muy diferentes se hizo una clasificación previa de los mismos para poder comprobar después si, al igual que en los peces, existía una relación entre el tamaño y la concentración de mercurio.

Los bivalvos analizados se tomaron manualmente en el punto S-5 del embalse de La Serena coincidiendo con el muestreo de aguas y sedimentos correspondiente a julio de 2006 y pertenecían a una especie de bivalvo de agua dulce denominada *Unio pictorum*. A pesar de que sólo se dispone de muestras de un único punto del embalse de La Serena, es interesante estudiar precisamente dicho lugar ya que fue el que presentó las concentraciones superiores de mercurio en ese muestreo estacional tanto para aguas como para sedimentos. Los distintos bivalvos recogidos fueron clasificados en función del tamaño de su concha en 6 grupos como se indica en la *tabla 6.30*. De cada uno de los grupos se analizaron 3 individuos por lo que finalmente el estudio abarcó 18 individuos cuyo peso, una vez abiertos y quitada la concha, aparece también en la *tabla 6.30*. Se puede observar que, en general, hay una gran homogeneidad tanto en longitud como en peso entre los individuos de un mismo grupo salvo en el grupo F donde uno de los bivalvos es anormalmente grande y diferente al resto del grupo. Por lo tanto, puede que este individuo se comporte de forma distinta y quizá habría sido necesario crear una categoría independiente para él.

2.3.2.1 Contenidos de mercurio

Los resultados obtenidos en los análisis de especiación de mercurio realizados se muestran en la *tabla 6.30*, donde todas las concentraciones están expresadas en ng g^{-1} referidas a peso seco de muestra. Asimismo se indican los valores medios y la desviación estándar de cada parámetro calculados para cada uno de los 6 grupos así como considerando los 18 individuos conjuntamente.

Las concentraciones de mercurio encontradas en los bivalvos no fueron excesivamente altas al oscilar entre 40 y 450 ng g^{-1} (en peso seco). Para poder comparar estos valores con los límites establecidos por algunos organismos sería necesario referirlos a peso húmedo para lo cual vamos a utilizar el porcentaje de humedad calculado en un estudio anterior que se realizó en bivalvos de la especie *Unio pictorum* tomados en el río Valdeazogues (15). Así pues, teniendo en cuenta que la media de peso seco de una muestra fue el 25 % de la muestra húmeda, todas las muestras se encuentran muy por debajo de los límites máximos aceptados por la Comunidad Económica Europea (700 ng g^{-1} en peso húmedo) (92) y por la *United States Food and Drug Administration* (1000 ng g^{-1} en peso húmedo) (93) para las partes comestibles de organismos marinos.

Observando los resultados, no se aprecia una tendencia clara en cuanto a una posible relación entre el tamaño del bivalvo y la concentración de mercurio acumulada. No obstante, destaca el hecho de que dentro de un mismo grupo la concentración de monometilmercurio sea comparable entre los distintos individuos pero, sin embargo, no existe un comportamiento definido al tratar de relacionar cómo varía dicha concentración de unos grupos a otros. Cabe señalar que las concentraciones mayores de monometilmercurio las encontramos precisamente en los grupos A y F, es decir, los que incluyen los bivalvos de tamaños más extremos. En lo que respecta a los porcentajes de monometilmercurio, éstos oscilan entre el 10 y el 45 %, siendo su valor medio de 22 % por lo que es comparable con los porcentajes encontrados en otros trabajos (94, 95).

Tabla 6.30. Datos biométricos y contenidos de mercurio en los bivalvos del embalse de La Serena

Grupo	Muestra	Longitud (cm)	P _{húmedo} (g)	CH ₃ Hg ⁺ (ng g ⁻¹)	Hg ²⁺ (ng g ⁻¹)	Hg total (ng g ⁻¹)	CH ₃ Hg ⁺ (%)
A (<4 cm)	A1	3,5	0,70	75,6	245,1	320,7	23,6
	A2	3,7	0,99	41,7	77,6	119,2	34,9
	A3	3,8	1,32	42,7	401,2	443,9	9,6
	Media	3,7	1,00	53,3	241,3	294,6	22,7
	SD	0,2	0,31	19,3	161,8	163,9	12,7
B (4-5 cm)	B1	4,3	1,34	33,0	322,5	355,4	9,3
	B2	4,7	1,39	30,3	96,8	127,2	23,9
	B3	4,9	1,50	32,8	131,2	164,1	20,0
	Media	4,6	1,41	32,0	183,5	215,6	17,7
	SD	0,3	0,08	1,5	121,6	122,5	7,6
C (5-6 cm)	C1	5,2	5,04	16,9	20,8	37,7	44,9
	C2	5,5	3,23	15,1	28,3	43,4	34,8
	C3	5,8	2,93	21,4	28,1	49,5	43,3
	Media	5,5	3,73	17,8	25,7	43,5	41,0
	SD	0,3	1,14	3,3	4,3	5,9	5,4
D (6-7 cm)	D1	6,4	4,25	19,4	100,6	120,0	16,2
	D2	6,5	4,10	11,9	92,7	104,6	11,4
	D3	6,6	5,96	19,2	85,1	104,3	18,4
	Media	6,5	4,77	16,9	92,8	109,6	15,3
	SD	0,1	1,03	4,3	7,8	9,0	3,6
E (7-8 cm)	E1	7,1	5,78	24,6	129,0	153,5	16,0
	E2	7,2	7,85	19,5	235,4	254,9	7,7
	E3	7,3	9,35	26,1	241,9	268,0	9,7
	Media	7,2	7,66	23,4	202,1	225,5	11,1
	SD	0,1	1,79	3,5	63,4	62,7	4,3
F (>8 cm)	F1	8,5	19,11	33,7	82,0	115,7	29,1
	F2	8,7	19,55	21,7	55,1	76,8	28,2
	F3	11,0	56,63	51,3	243,9	295,2	17,4
	Media	9,4	31,76	35,6	127,0	162,6	24,9
	SD	1,4	21,54	14,9	102,1	116,5	6,5
N=18	MEDIA	6,2	8,4	29,8	145,4	175,2	22,1
	SD	2,0	13,3	15,5	109,8	118,7	11,6

(Concentración de Hg total calculada como la suma de las concentraciones de CH₃Hg⁺ y Hg²⁺)

En cuanto al mercurio inorgánico, existe aún una heterogeneidad mayor ya que ni siquiera es comparable el valor obtenido en los diferentes grupos lo que parece señalar que la cantidad de mercurio inorgánico acumulado vendrá regida por algún otro factor. Al encontrarse la mayoría de los bivalvos semienterrados en el sedimento, quizá la diversidad entre los niveles de mercurio encontrados se deba precisamente al mayor o menor contacto que existe entre el bivalvo y la fracción de mercurio inorgánico disponible del sedimento.

No obstante, para obtener una mejor comprensión de los datos obtenidos pueden representarse las concentraciones de las especies de mercurio analizadas, es decir, metilmercurio y mercurio inorgánico frente a los parámetros biométricos del bivalvo, como la longitud de su concha y su peso (*figura 6.12*).

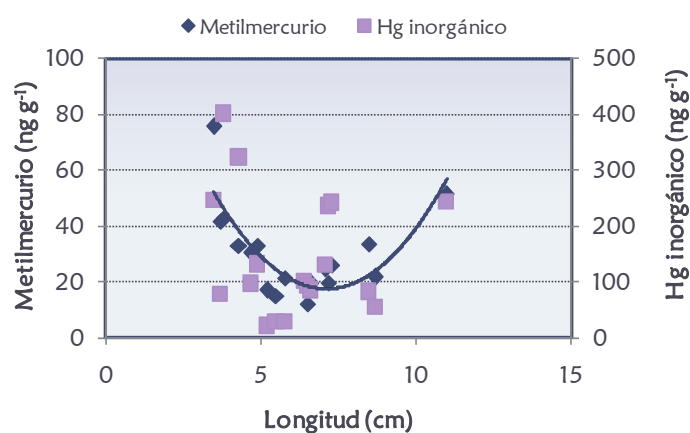


Figura 6.12. Gráficos de dispersión que muestran las tendencias entre las concentraciones de mercurio y la longitud de los bivalvos

En la *figura 6.12* se intuye una relación parabólica entre la concentración de monometilmercurio y la longitud ya que en principio la concentración va disminuyendo al ir aumentando la longitud pero una vez alcanzado un mínimo en torno a los 6-7 cm empieza a aumentar

proporcionalmente con el tamaño. Sin embargo, esta posible relación no se observa en el mercurio inorgánico donde los puntos se disponen de manera aleatoria y no parecen venir controlados por ningún factor, como lo indicaba también la gran desviación estándar que presentaban estos valores.

2.3.2.2 Factores de bioacumulación

Una vez conocidas las concentraciones de las diferentes especies de mercurio en los bivalvos, se pretendió de nuevo estudiar la interacción existente entre los distintos compartimentos acuáticos. Así pues, tal y como se hizo para los peces, se procedió a analizar la bioacumulación que se había producido. En este caso, como la proporción de mercurio inorgánico en estos organismos era superior a la de metilmercurio, no sólo se calcularon los factores de bioacumulación del metilmercurio sino también los del mercurio inorgánico respecto al agua y al sedimento, utilizando las expresiones anteriores indicadas en el estudio de los peces del río Valdezogues.

Los valores obtenidos para todos estos factores se resumen en la *tabla 6.37* donde se indica el intervalo en el que se encuentra cada uno de los parámetros para el metilmercurio y el mercurio inorgánico así como el valor medio y la desviación estándar en los 18 valores. Para el cálculo del BAF del mercurio inorgánico respecto al sedimento se consideró la fracción de mercurio disponible en lugar de la concentración total.

En general, los logaritmos de los factores de bioconcentración vuelven a ser superiores respecto a las concentraciones de mercurio encontradas en el agua que en los sedimentos, tal y como se comprobó en los peces del río Valdezogues. Los logaritmos de BAF_{aguas} para el metilmercurio varían entre 5,2 y 6,0 por lo que son mayores que los del mercurio inorgánico que oscilan entre 3,2 y 4,5. Esta tendencia se corresponde con la recogida en otro trabajo donde también se estudió esta misma especie de bivalvos (*Unio pictorum*) en un lago (94), pues en ese caso también se observó una mayor bioacumulación o bioconcentración del metilmercurio. Además los valores obtenidos en ese trabajo (logaritmo de

BAF para el metilmercurio de 4,96 y para el mercurio inorgánico de 4,06) fueron similares a los de este estudio.

Tabla 6.31. Logaritmos de los factores de bioacumulación de metilmercurio y mercurio inorgánico para agua y sedimento en los bivalvos

	METILMERCURIO		Hg INORGÁNICO	
	log BAF _{agua}	log BAF _{sedimento}	log BAF _{agua}	log BAF _{sedimento}
Valor mínimo	5,17	0,55	3,25	-0,80
Valor máximo	5,98	1,35	4,54	0,49
Media	5,52	0,90	3,96	-0,09
SD	0,20	0,20	0,37	0,37

En cuanto a la bioacumulación respecto al sedimento, se observa que los valores para el metilmercurio son superiores a los del mercurio inorgánico. No obstante, pese a que los valores de los logaritmos de BAF indican que esta bioacumulación es menor que la que se produce respecto a las aguas, se comprueba que en los bivalvos hay indicios de bioacumulación de metilmercurio respecto al sedimento (log BAF=0,90) que no se daban en los peces donde se obtuvieron valores negativos para el logaritmo del factor de bioacumulación (log BAF=-0,08). Este hecho puede ser debido a que los bivalvos al ser organismos que se encuentran semienterrados en el sedimento presentan una mayor interacción con este compartimento. Además los valores de log BAF_{sedimento} encontrados son similares a los encontrados para la misma especie en un estudio realizado en una zona no tan expuesta a la contaminación por mercurio como es el Lago Balaton (Hungría) (94), donde se obtuvieron valores de 0,93 para el metilmercurio y -0,18 para el mercurio inorgánico. Todo ello indica que los bivalvos son un buen indicador de los niveles de mercurio en la componente biológica de un ecosistema acuático ya que son muy sensibles a la transferencia de mercurio desde otros compartimentos aunque la concentración disponible de este metal no sea muy elevada.

2.4 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

La información dada en los apartados anteriores, resumida en la *tabla 6.32*, va a permitir estudiar las interacciones entre los distintos compartimentos del ambiente acuático del río Valdeazogues y el embalse de La Serena así como evaluar el presente estado de contaminación por mercurio de la Comarca de Almadén, comparándolo con otras zonas que también han estado expuestas a actividades mineras.

Tabla 6.32. Concentraciones de mercurio total y metilmercurio encontradas en cada uno de los compartimentos del río Valdeazogues y el embalse de La Serena

Punto	Hg total			Metilmercurio		
	Agua* (ng L ⁻¹)	Sedimento (μg g ⁻¹)	Biota (ng g ⁻¹)	Agua (ng L ⁻¹)	Sedimento (μg g ⁻¹)	Biota (ng g ⁻¹)
V-1	3,8-17,9	7,18	---	2,60	10,20	---
V-2	11,4-93,4	21,94	---	0,33	8,58	---
V-3	24,2-87,7	73,87	---	4,93	881,3	---
V-4	30,0-136,1	13,41	4,2-42,9	1,04	10,93	4,2-40,7
S-1	7,8-10,0	1,70	---	0,17	5,95	---
S-2	6,0-28,4	1,83	---	0,16	3,79	---
S-3	8,3-19,5	1,38	---	0,30	5,71	---
S-4	11,1-13,3	---	---	0,10	3,39	---
S-5	10,6-54,8	0,445	37,7-444	0,08	2,42	11,9-75,6
S-6	2,5-11,1	0,508	---	0,04	10,20	---

(*: Concentraciones de mercurio total en la fracción disuelta de las aguas)

2.4.1 INTERACCIÓN ENTRE LOS DISTINTOS COMPARTIMENTOS

Analizando los resultados obtenidos para cada uno de los compartimentos estudiados en el río Valdeazogues, se observa que el

mercurio está acumulado principalmente en los sedimentos, ya que sus niveles están muy por encima del valor de $1 \mu\text{g g}^{-1}$ que puede establecerse como nivel de fondo o control. Mientras que en las aguas los contenidos de mercurio disuelto están, en general, muy por debajo de los límites establecidos por diferentes organismos que, como ya se indicó, son del orden de $1\text{-}2,4 \mu\text{g L}^{-1}$ (49, 51). Además se comprobó que la mayor parte del mercurio presente en las aguas no se encontraba en la fracción disuelta sino en la particulada. Cabría esperar que los sedimentos actuaran como una fuente continua de mercurio a los organismos que resultara en concentraciones elevadas en la biota. Sin embargo, las concentraciones encontradas en los peces fueron muy bajas. Quizá este hecho se deba a que en el punto de muestreo V-4 donde se tomaron los peces, sólo un 10 % del mercurio del sedimento se encontraba en su forma disponible por lo que al encontrarse la mayor parte del mercurio fuertemente retenido en el sedimento no fue tan fácilmente acumulado en los peces.

Por otro lado, en cuanto a las muestras del embalse de La Serena, se observa como el hecho de desembocar el río Valdeazogues en dicho embalse parece tener una cierta influencia en cuanto a los niveles de mercurio encontrados en los sedimentos ya que los valores mayores se encuentran en los puntos S-1, S-2 y S-3, más cercanos a la desembocadura del río Valdeazogues, mientras que los sedimentos tomados en los otros dos puntos no presentan contaminación por mercurio, pues únicamente encontramos en ellos concentraciones del orden de $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ de mercurio. Por su parte, en las aguas del embalse encontramos concentraciones de mercurio bajas pero, en algunos casos puntuales, son del orden de las del río Valdeazogues en algunos de los muestreos estacionales. No obstante, en el embalse se observa un cierto efecto de bioacumulación de mercurio mayor que en el río Valdeazogues ya que, a pesar de que los niveles de mercurio encontrados en los bivalvos no son tampoco excesivamente altos, dichas concentraciones son del orden de 10 veces mayores a las encontradas en los peces del río. Además, aunque en la biota las concentraciones de mercurio total no sean altas, cabe señalar que un gran porcentaje de dicho mercurio se encuentra en

forma de metilmercurio (del orden del 70 al 100 % en los peces y del 10 al 45 % en los bivalvos), lo que supone una acumulación muy importante con respecto a los niveles encontrados en los sedimentos donde en la mayoría de los casos no superan el 0,5 %.

2.4.2 EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN POR MERCURIO EN LA COMARCA DE ALMADÉN

La evaluación de la contaminación por mercurio en la Comarca de Almadén presenta numerosas dificultades. Una de ellas sería el hecho de que al existir en la zona yacimientos naturales de mercurio, es difícil distinguir qué parte estaría de forma natural y cuál procede de la explotación de dichos yacimientos. Por otro lado, se encuentra el problema de que las clasificaciones existentes para evaluar la contaminación están propuestas basándose en zonas donde no hay yacimientos de mercurio y prácticamente todo tiene que tener un origen antropogénico. Atendiendo a todo lo anterior, para evaluar la contaminación por mercurio en la zona objeto de estudio habría que comparar los resultados obtenidos con estudios realizados en zonas que están expuestas al mismo tipo de contaminación, es decir, que se encuentran situadas en el seno de áreas donde hay también yacimientos de mercurio y que están expuestas a contaminación por mercurio debido a actividades mineras.

Las zonas seleccionadas para comparar los valores obtenidos en las muestras del río Valdeazogues (*tabla 6.33*) son la cuenca del río Carson (56, 59, 96-99) y la del río Humboldt (100), ambos en Nevada, Estados Unidos, la región de Kuskokswin (Sudoeste de Alaska) (45, 101-103), la cordillera litoral de California (104), el río Idrijca (Idrija, Eslovenia) (105-106), las minas de mercurio de Palawan (Filipinas) (107), el Monte Amiata (Italia) (108-110), y la cuenca del río Pra en Ghana (111). Todos estos lugares se corresponden con minas de mercurio abandonadas donde el principal mineral era el cinabrio excepto en los casos de las cuencas de los ríos Carson (Nevada) y Pra (Ghana) que están contaminadas con mercurio elemental debido al uso del mercurio en el proceso de extracción del oro por amalgamación.

Tabla 6.33. Concentraciones de mercurio total en aguas y sedimentos de zonas contaminadas por actividades mineras

Localización	Aguas (ng L ⁻¹)	Sedimentos (µg g ⁻¹)
Río Carson, Nevada (56, 59, 96-99)		
Aguas arriba de las minas	4-28	0,03-6,1
Aguas abajo de las minas	645-2.107	0,05-881
Río Humboldt, Nevada (100)		
Río Humboldt	2,2-9,0	0,008-0,28
Aguas abajo de las minas	3,1-13	0,80-1,70
Región Kuskokwin, Alaska (45, 101-103)		
Aguas arriba de las minas	0,1-14	0,02-0,78
Aguas abajo de las minas	1,0-2.500	0,90-5.500
Minas Cordillera Litoral, California (104)		
Drenaje de las minas	2-11.000	0,4-400
Minas Idrija, Eslovenia (105, 106)		
Aguas arriba de las minas	<3	2
Aguas abajo de las minas	6-322	0,77-1.347
Minas Palawan, Filipinas (107)		
Aguas arriba de las minas	12-66	-
Aguas abajo de las minas	120-34.000	6,9-400
Monte Amiata, Italia (108-110)	<10	3-10
Río Pra, Ghana (111)	29-462	0,002-2,917

Al comparar las concentraciones de mercurio encontradas en las aguas del río Valdeazogues con las descritas en la bibliografía (*tabla 6.33*), se comprueba que los valores obtenidos fueron, en general, inferiores a los de otros estudios. Los niveles de mercurio aguas abajo oscilaron entre 11 y 136 ng L⁻¹, por lo que se quedaron muy por debajo de los altos contenidos

alcanzados en las minas de Palawan (Filipinas) donde se llegó a concentraciones de 34.000 ng L^{-1} o del río Carson y la región de Kuskokwin (USA) donde se alcanzaron en torno a los $2.100\text{-}2.500 \text{ ng L}^{-1}$. Sin embargo, son del orden de las concentraciones halladas en el río Idrija (Idrija, Eslovenia) donde estuvieron entre $6\text{-}322 \text{ ng L}^{-1}$. En cuanto a los niveles de mercurio en las aguas minas arriba, nuestros valores ($4\text{-}18 \text{ ng L}^{-1}$) son parecidos a los encontrados en el resto de estudios donde no se rebasaron en ningún caso los 66 ng L^{-1} . No obstante, las concentraciones de mercurio en las aguas del río Valdezogues son en general bajas por lo que no suponen un riesgo para la salud humana aunque, en cualquier caso, las aguas de este río no son utilizadas para consumo humano. Estos bajos niveles de mercurio pueden relacionarse con la alta volatilidad del mercurio y su tendencia a ser adsorbido por las arcillas y óxidos microcristalinos, sedimentos y materia orgánica (112). El pH alcalino de las aguas podría ser también parcialmente responsable porque se ha descrito una relación inversa entre el pH y la biodisponibilidad del mercurio (113).

En lo que respecta a los sedimentos, en el río Valdezogues se encontraron niveles de mercurio de $13\text{-}74 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ aguas abajo de la zona minera y de $7 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ aguas arriba. De nuevo el valor hallado aguas arriba es superior a los descritos en la bibliografía (*tabla 6.33*) donde, en general, las concentraciones de mercurio iban desde unos pocos ng g^{-1} a $1 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$, como ocurre en el río Humboldt y en la región de Kuskokwin, alcanzándose sólo valores superiores en Idrija ($2 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$) y en el río Carson donde se llegó a un valor próximo al nuestro de $6 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$. Sin embargo, aguas abajo de las minas la tendencia cambia ya que los niveles de mercurio encontrados en los sedimentos del río Valdezogues son inferiores a los altos contenidos alcanzados en la mayor parte de los lugares indicados donde los valores máximos oscilan entre los $400 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ encontrados en las minas de Palawan y los $5.500 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ hallados en la región de Kuskokwin. Por tanto, podemos considerar que los valores más próximos son los de la mina del Monte Amiata (Italia) aunque no tan altos como los niveles de mercurio

encontrados en los sedimentos del río Valdezogues con un valor máximo de $10 \mu\text{g g}^{-1}$.

En cuanto a la especiación de mercurio, podemos indicar que la proporción de metilación en los sedimentos del río Valdezogues estuvo, en general, en torno al 0,05-0,15 %, valor que podría considerarse bajo pero que se justifica por el hecho de que la conversión del cinabrio en metilmercurio suele ser muy limitada debido a que el cinabrio es un mineral muy resistente al ataque físico y químico y poco soluble en agua (114). No obstante, en uno de los puntos de muestreo del río Valdezogues se obtuvo una concentración cercana a los 880 ng g^{-1} de metilmercurio lo que supone un 1,2 % de metilación, valor próximo a los porcentajes de 1-3 % encontrados en otros estudios del río Carson (Nevada) (98) o el Monte Amiata (Italia) (108).

Los resultados obtenidos en los sedimentos del río Valdezogues también pueden compararse con los datos correspondientes a otros estudios realizados previamente en la Comarca de Almadén (5, 10, 15) ya que existen estaciones de muestreo coincidentes con ellos. Berzas Nevado *et al.* (15) realizaron un estudio de la distribución de mercurio en el período comprendido entre 1995 y 1997 en el que se pueden localizar datos correspondientes a todos nuestros puntos de muestreo del río Valdezogues. Además, puede realizarse una comparación con el estudio llevado a cabo entre 1974 y 1977 por Hildebrand *et al.* (10), pues existen puntos equivalentes entre ambos trabajos, tales como el V-3 situado después de los vertidos procedentes de la mina de Almadén y el V-4 localizado en la confluencia entre el río Valdezogues y el río Guadalmez. Por último, hay correspondencias con el trabajo que Gray *et al.* (5) realizaron en muestras tomadas en junio de 2003 en cuanto a los puntos situados aguas arriba de las minas, es decir, V-1 y V-2.

Las concentraciones de mercurio total en sedimentos correspondientes a cada uno de estos estudios se presentan en la *tabla 6.34*.

Tabla 6.34. Comparación de los contenidos totales en mercurio ($\mu\text{g g}^{-1}$) para los sedimentos del río Valdezogues en diferentes períodos

Punto muestreo	1974-1977	1995-1997	2003	2006 (este estudio)
V-1	-	$5,53 \pm 0,69$	~8	$7,18 \pm 0,11$
V-2	-	$74,4 \pm 1,70$	~20	$21,94 \pm 1,22$
V-3	1085 ± 681	$107,2 \pm 2,72$	-	$73,87 \pm 4,34$
V-4	203 ± 88	$14,84 \pm 0,82$	-	$13,41 \pm 0,87$

Los resultados obtenidos en nuestro estudio confirman la tendencia de los niveles de mercurio en los sedimentos del río Valdezogues a disminuir con el tiempo, ya observada por Berzas *et al.* (15). Este descenso es especialmente significativo entre los períodos 1974-1977 y 1995-1997 ya que en los 20 años que separan ambas etapas se produjo un importante descenso de la actividad minera así como la instalación de una planta de tratamiento de residuos de la mina que tuvo lugar en 1977. No obstante, en los 10 años que separan el estudio de Berzas *et al.* y el de esta Memoria, las concentraciones de mercurio en los sedimentos han seguido disminuyendo aunque no de manera tan pronunciada. El descenso más significativo lo experimenta el punto V-2, que es el punto más cercano aguas arriba de la mina de Almadén, que ya ofrecía un valor de ese orden unos años antes en el trabajo de Gray *et al.* (5). Además, apenas existen diferencias entre los contenidos encontrados en el punto V-4, lo que indica que pese al descenso observado en otros puntos de muestreo, el nivel de fondo de mercurio en los sedimentos del río Valdezogues continúa siendo del mismo orden que hace unos 10 años.

Por otro lado, para comparar los valores obtenidos en las muestras del embalse de La Serena habría que recurrir también a lugares con características similares como serían aguas embalsadas en forma de lagos o presas en zonas con antiguas minas de mercurio o con actividades mineras

asociadas a la amalgamación por mercurio, como se ha hecho para las muestras del río Valdeazogues. Por este motivo, los lugares seleccionados para realizar la comparación son el embalse de Lahontan que pertenece a la cuenca del río Carson (Nevada) (56, 99, 115), el embalse de Rye Patch (100) que se encuentra en la cuenca del río Humboldt (Nevada), el Lago Clear (California) (96, 116) y la presa situada en el arroyo Davis (California) (96). Las concentraciones de mercurio total encontradas en aguas y sedimentos de estos embalses o lagos se indican en la *tabla 6.35*.

Tabla 6.35. *Concentraciones de mercurio total en aguas y sedimentos de aguas estancadas contaminadas por actividades mineras*

Localización	Aguas (ng L ⁻¹)	Sedimentos (µg g ⁻¹)
Embalse Lahontan, Nevada (56, 99, 115)	57-1.582	0,011-99
Embalse Rye Patch, Nevada (100)	2,1-8,0	0,05-0,15
Lago Clear, California (96, 116)	3,6-700	0,5-83
Presa del arroyo Davis, California (96)	5,6	-
Embalse de La Serena (*)	2,5-55	0,4-1,8

(*): Este trabajo

Al comparar los niveles de mercurio en el embalse de La Serena, tanto en aguas como en sedimentos, con los obtenidos en otros embalses o lagos (*tabla 6.35*) se observa que nuestros valores no alcanzan concentraciones de mercurio tan elevadas como las encontradas en el embalse de Lahontan (Nevada) donde se superan los 1.500 ng L⁻¹ en las aguas y se llega casi a los 100 µg g⁻¹ en los sedimentos. Concentraciones elevadas y distantes de nuestros valores se recogen también en el Lago Clear donde las concentraciones máximas de mercurio son 700 ng L⁻¹ en aguas y 83 µg g⁻¹ en sedimentos. Sin embargo, en el embalse Rye Patch (Nevada) se encuentran valores que están por debajo de los del embalse de La Serena, tal y como ocurría con el río Humboldt en cuyo curso se encuentra este embalse.

Debido a que La Serena es un embalse de reciente construcción no existen estudios previos de la contaminación por mercurio en dicho sistema y por este motivo no es posible comparar los valores obtenidos con otros tomados en las mismas estaciones de muestreo ni poder analizar la evolución de los niveles de mercurio con el tiempo. Así pues, para completar este estudio y comprobar los posibles efectos de las aguas recientemente inundadas en los procesos de metilación sería necesario realizar nuevas investigaciones en esta materia.

A pesar de que los resultados obtenidos en los análisis de especiación de mercurio en la biota son preliminares, al no abarcar un gran número de muestras ni de puntos de muestreos, van a compararse con los datos recogidos en la bibliografía correspondientes a otros estudios de la biota de la Comarca de Almadén o del mismo tipo de organismos en otros ecosistemas acuáticos. Al no existir datos previos de la contaminación por mercurio en peces de la zona estudiada, las concentraciones de mercurio y metilmercurio de los peces del río Valdeazogues se van a comparar con los valores obtenidos en especies autóctonas de lugares que presentan minas abandonadas de mercurio (45, 117) o donde se utiliza dicho metal para el proceso de extracción del oro por amalgamación (118, 119) (*tabla 6.36*).

Los niveles de mercurio total en tejido muscular de peces de otras zonas reflejados en la *tabla 6.36* son en todos los casos superiores a los de los peces del río Valdeazogues que no superaban los 50 ng g⁻¹. No obstante, este valor es del orden de los valores mínimos encontrados en algunos peces de la Bahía Honda (Palawan, Filipinas) y del río Maroni (Guayana Francesa) que se corresponden con las especies de menor tamaño. Esto confirma que los contenidos en mercurio en peces están fuertemente controlados por los parámetros biométricos del pez y, por lo tanto, los valores encontrados en los peces del río Valdeazogues son tan bajos debido seguramente al pequeño tamaño de los individuos muestreados. En cuanto al porcentaje de monometilmercurio presente en el músculo, los valores obtenidos tanto en los peces percasol, que ofrecieron un porcentaje muy próximo al 100 %,

como en los black bass (aproximadamente del 76 %) están en concordancia con los encontrados en estos trabajos (5, 118, 119).

Tabla 6.36. Concentraciones de mercurio total y metilmercurio en músculo de peces comparativas de zonas contaminadas por actividades mineras

Localización	Hg total (ng g ⁻¹)	CH ₃ Hg ⁺ (%)
Región Kuskokwin, Alaska (45)	100-620	>90 %
Bahía Honda, Palawan, Filipinas (117)	30-1.070	-
Río Katingan, Indonesia (118)	200-580	75-95 %
Río Maroni, Guayana Francesa (119)	54-6.141	~80 %
Río Valdezogues (*)	4.2-42.9	76-99 %

(*): Este trabajo

En lo que se refiere a los bivalvos, en primer lugar, podemos comparar las concentraciones de mercurio encontradas con las obtenidas en bivalvos de la misma especie (*Unio pictorum*) por Berzas et al. (15) (tabla 6.37), que fueron tomados en el río Valdezogues.

Tabla 6.37. Concentraciones de mercurio total y metilmercurio en bivalvos de la especie *Unio pictorum* tomados en la Comarca de Almadén

Localización	Hg total (ng g ⁻¹)	CH ₃ Hg ⁺ (ng g ⁻¹)	CH ₃ Hg ⁺ (%)
Río Valdezogues (15)	1.310-4.600	590-2.670	20-40 %
Embalse de La Serena (*)	37,7-444	11,9-75,6	10-45 %

(*): Este trabajo

Como se observa en la tabla 6.37, las concentraciones obtenidas en los bivalvos tomados en el río Valdezogues fueron mucho más altas que las

encontradas en los mismos organismos en el embalse de La Serena, lo cual puede deberse a que los niveles de mercurio en aguas y sedimentos son también muy superiores en el río. Sin embargo, en cuanto al porcentaje de monometilmercurio presente en los bivalvos se obtienen valores similares lo que indica que estos organismos se comportan del mismo modo en cuanto a los procesos de metilación y bioacumulación del mercurio independientemente de la zona de muestreo.

Asimismo podríamos tratar de comparar las concentraciones obtenidas en los bivalvos con las halladas por Higuera et al. (17) en crustáceos de la zona de la especie *Procambarus clarkii*. No obstante, estos cangrejos fueron también tomados en puntos situados aguas arriba de Almadén pero influenciados por otras minas cercanas por lo que no presentan la misma exposición al mercurio que los bivalvos del embalse de La Serena. Por este motivo, los niveles de mercurio total encontrados en el músculo de los cangrejos oscilaron entre 2.380 y 9.060 ng g⁻¹, valores de nuevo muy superiores a los obtenidos en los bivalvos. Además incluso las concentraciones halladas en cangrejos tomados en un punto control situado en el Pantano de Saceruela fueron más altas que las de los bivalvos al encontrarse entre 394 y 2.050 ng g⁻¹. Todo ello parece indicar que los cangrejos son unos organismos con mayor facilidad para bioacumular el mercurio. Así, a diferencia de los niveles de mercurio encontrados en los cangrejos que serían preocupantes al poder suponer un riesgo para la población de la zona, los valores encontrados en los bivalvos del embalse de La Serena no llegaron a contenidos de ese orden.

Por último, puede realizarse una comparación respecto a los valores encontrados en bivalvos o zooplancton tomados en ambientes acuáticos contaminados por mercurio como el Golfo de Trieste (Eslovenia) (120) o la Bahía Honda en Palawan (Filipinas) (117) y en lagos situados en zonas menos expuestas a la contaminación por mercurio (94, 121, 122). Los resultados indicados en la *tabla 6.38* se corresponden a bivalvos de la especie *Unio pictorum* (94), a bivalvos de gran tamaño de la especie *Perna viridis* (117) y a zooplancton (120-122).

Tabla 6.38. Concentraciones de mercurio total y metilmercurio en bivalvos y zooplancton comparativas de diferentes lagos

Localización	Tipo de muestra	Hg total (ng g ⁻¹)	CH ₃ Hg ⁺ (ng g ⁻¹)
Lago Balaton, Hungría (94)	<i>Unio pictorum</i>	14-42	1-13
Bahía Honda, Filipinas (117)	<i>Perna viridis</i>	860-4.370	-
Golfo de Trieste, Eslovenia (120)	Zooplancton	14-959	2,1-65,7
Lagos de Wisconsin, USA (121)	Zooplancton	20-153	2-45
Lago Ontario, Canadá (122)	Zooplancton	19-480	-
Embalse de La Serena (*)	<i>Unio pictorum</i>	37,7-444	11,9-75,6

(*) : Este trabajo

Analizando estos valores, se comprueba que las concentraciones de mercurio y monometilmercurio encontradas en los bivalvos del embalse de La Serena, si bien eran inferiores a los valores obtenidos en otros estudios de la Comarca de Almadén (15, 17), son del orden de los niveles hallados en otra zona expuesta a la contaminación de mercurio como es el Golfo de Trieste (Eslovenia) (120), especialmente en cuanto al monometilmercurio. Por su parte, el contenido en mercurio total también es parecido al encontrado en zooplancton del lago Ontario (Canadá) (122). Además, como era de esperar, los bivalvos del embalse de La Serena presentan concentraciones de ambas especies de mercurio superiores a bivalvos (94) o zooplancton de otros lagos no contaminados por mercurio (121). Sin embargo, no se alcanzan valores tan elevados como los encontrados en los bivalvos de otra especie en la bahía Honda (Palawan, Filipinas).

3.- CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se pueden extraer para el hidrosistema constituido por el río Valdeazogues a su paso por la Comarca de Almadén y el embalse de La Serena desde el punto de vista de la contaminación por mercurio son las siguientes:

- Todas las aguas analizadas presentan bajas concentraciones de mercurio en la fracción disuelta pues son inferiores a $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$, excepto para uno de los puntos del río Valdeazogues que llegó a 136 ng L^{-1} en uno de los muestreos, lo que indica la baja tendencia del mercurio a permanecer en disolución en el agua. Además cabe señalar que las concentraciones más altas se encontraron siempre en los puntos del río Valdeazogues situados aguas abajo de Almadén (V-3 y V-4) que son los que recibían más directamente la influencia de la actividad minera.
- Las concentraciones de mercurio en la fracción particulada de las aguas oscilan en un amplio intervalo de valores llegando a alcanzar los $86 \mu\text{g g}^{-1}$. Sin embargo, existe una diferencia menos marcada entre los contenidos encontrados en las aguas del río Valdeazogues y el embalse de La Serena considerando cada uno de los muestreos estacionales independientemente.
- La fracción particulada es la predominante en lo que a la concentración de mercurio se refiere pues supone del orden del 90-99 % del mercurio total de las aguas, como indican los valores obtenidos para el logaritmo del coeficiente de distribución de las especies que oscilaron entre 3,9 y 6,6.
- Existe una importante influencia estacional en los contenidos de mercurio en las aguas, que se refleja especialmente en los niveles de mercurio particulado del embalse de La Serena donde en el muestreo de verano se obtienen valores muy superiores a los

muestreos de otoño e invierno, que llegan a ser comparables con los del río Valdeazogues.

- Las concentraciones de monometilmercurio en las aguas presentan importantes diferencias entre ambas zonas de muestreo, pues en el embalse de La Serena, no superan los 0,3 ng L⁻¹, mientras que en el río Valdeazogues oscilan desde ese valor hasta casi los 5 ng L⁻¹. No obstante, en general, suponen menos del 1 % del mercurio total salvo para algunos puntos del río donde llegan a representar del 1-4 %.
- Los distintos parámetros analizados para realizar la caracterización hidroquímica de las aguas afectan de forma diferente a los niveles de mercurio encontrados en el río Valdeazogues y el embalse de La Serena. Esto se justifica por las diferencias existentes entre ambos tipos de aguas en cuanto a la conductividad y los contenidos en carbono orgánico total, clorofila *a* y sólidos disueltos pues son superiores en las aguas del río. Asimismo también se observa una variabilidad estacional en la influencia de cada uno de estos parámetros sobre los contenidos en mercurio.
- La comparación de los contenidos de mercurio total y metilmercurio encontrados en las aguas con los niveles de otras zonas no contaminadas o los niveles de fondo de la Comarca de Almadén indica que las muestras del embalse de La Serena pueden considerarse no contaminadas en cuanto al metilmercurio y prácticamente tampoco lo están en cuanto al mercurio total aunque dos de las muestras (S-3 y S-5) exceden el límite establecido para este contenido. Sin embargo, las muestras del río Valdeazogues presentan niveles de metilmercurio superiores que hacen que dichas muestras se consideren como “contaminadas”, salvo en el caso del punto V-2, situado aguas arriba, que tiene un comportamiento similar a algunos puntos del embalse de La Serena.

- Las concentraciones de mercurio total en los sedimentos del río Valdezogues oscilan entre 7 y 74 $\mu\text{g g}^{-1}$ mientras que en el embalse de La Serena no superan los 2 $\mu\text{g g}^{-1}$. Además, de esta marcada diferencia en cuanto a la zona de muestreo, los resultados obtenidos indican una clara influencia de los vertidos procedentes de las minas lo que se manifiesta en el punto V-3 que ofrece el valor más alto de 74 $\mu\text{g g}^{-1}$. Asimismo en los sedimentos del embalse de La Serena se observa que los contenidos de mercurio en los puntos correspondientes a la entrada del río Valdezogues son superiores a los que se encuentran en la zona de mezcla del embalse.
- Los porcentajes de mercurio inorgánico extraíble en los sedimentos varían en un amplio intervalo de valores que van del 11-30 %, con la excepción del punto V-3 donde es del 64 %, lo que indica que la disponibilidad del mercurio no depende de las condiciones de extracción sino de las características de cada sedimento.
- En cuanto a las concentraciones de monometilmercurio en los sedimentos, éstas no ofrecen diferencias tan considerables entre las muestras del río Valdezogues y el embalse de La Serena, sin considerar el punto V-3 que tiene un comportamiento diferente al resto. Así, los contenidos en monometilmercurio en el embalse oscilan entre 2,4 y 6,0 ng g^{-1} mientras que en el río están en torno a 10 ng g^{-1} , salvo en el caso del punto V-3 donde se alcanzan 880 ng g^{-1} . Por tanto, los porcentajes de metilación correspondientes a las muestras del embalse son algo superiores al oscilar entre 0,2 y 0,8 % mientras que en el río son inferiores a 0,1 %, con excepción del punto V-3 (1,2 %). No obstante, los porcentajes de metilación son en todos los casos inferiores al 1,5 %.
- Los distintos parámetros analizados para caracterizar los sedimentos no presentan marcadas influencias en los contenidos de mercurio encontrados. No obstante, el monometilmercurio

tiene una cierta tendencia a asociarse en igual proporción con la materia orgánica y con los hidróxidos de hierro. Asimismo se observa una clara relación inversa entre los niveles de mercurio total y extraíble y la distancia a la que se encuentran los puntos de muestreo respecto a la mina de Almadén.

- Al comparar los resultados obtenidos en los sedimentos con los niveles de fondo de la zona estudiada se observa que sólo algunos puntos del embalse de La Serena pueden considerarse como “no contaminados” aunque el resto no rebasan en exceso los límites establecidos. En cuanto a los puntos del río Valdeazogues, presentan valores alejados a los niveles de fondo o “control” tanto para mercurio total como para monometilmercurio, especialmente en el caso del punto V-3, que recibe más directamente la influencia de los vertidos que procedían de la mina de Almadén.
- Ha sido posible comparar la concentración de mercurio en los sedimentos del río Valdeazogues con varios períodos anteriores (1974-77, 1995-97 y 2003) observando que los valores encontrados en el primer período son mucho más altos que los correspondientes al período actual. Además se observa una disminución progresiva con el tiempo en los contenidos de los sedimentos de los puntos situados aguas abajo que no es tan clara en los situados aguas arriba debido a que no se dispone de los valores del período 1974-77 para estos puntos.
- La comparación realizada entre los contenidos de mercurio encontrados en las aguas y los sedimentos con otros estudios de zonas expuestas también a contaminación por mercurio debido a actividades mineras muestra que las concentraciones obtenidas en el sistema Río Valdeazogues - Embalse de La Serena no alcanzan los niveles obtenidos en otros ecosistemas acuáticos, aun siendo elevadas en algunos casos puntuales.

- Se ha estudiado la interacción entre los distintos compartimentos del río Valdeazogues analizando también peces autóctonos de la zona que no presentaron grandes diferencias en cuanto a sus parámetros biométricos. El monometilmercurio es la especie predominante en el tejido muscular de estos peces pues supone del 76 al 99 % del mercurio total cuya concentración osciló entre 4 y 43 ng g⁻¹. Todos los individuos analizados presentaron un buen índice de estado nutricional por lo que los bajos contenidos de mercurio encontrados guardan una estrecha relación con el pequeño tamaño de los peces.
- Se ha realizado una primera aproximación a los niveles de mercurio en la componente biológica del embalse de La Serena a través de un bivalvo autóctono utilizado como indicador. Los contenidos de mercurio total encontrados están en el intervalo 38-444 ng g⁻¹, valores inferiores a otras zonas contaminadas pero del orden de los encontrados en otros estudios de bivalvos en lagos. Entre un 10 y un 45 % del mercurio total está en forma de monometilmercurio, lo que supone una acumulación muy importante con respecto a los niveles encontrados en los sedimentos lo cual es confirmado por los valores de los factores de bioacumulación obtenidos.
- Analizando los resultados obtenidos para cada uno de los compartimentos estudiados tanto en el río Valdeazogues como en el embalse de La Serena se encuentra que el mercurio está acumulado principalmente en los sedimentos. Sin embargo, en lo que respecta al monometilmercurio, éste se concentra en la componente biológica.

4.- BIBLIOGRAFÍA

1. **Rodríguez Martín-Doimeadios, R.C.** *Aportaciones al conocimiento del estado medioambiental de hidrosistemas de interés internacional situados en Castilla-La Mancha*. Tesis Doctoral: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Castilla-La Mancha, 1999.
2. **Ortega Gironés, E., Díez Viejobueno, C.** Estudio del distrito minero de Almadén (Ciudad Real, España). G. McMahon y F. Remy. *Grandes minas y la comunidad: Efectos socioeconómicos y ambientales en Latinoamérica, Canadá y España*. Alfaomega/IDRC/Banco Mundial, 2003.
3. **Saupé, F.** Geology of the Almadén mercury deposit, Province of Ciudad Real, Spain. *Economic Geology*. 1990, Vol. 85, p. 482-510.
4. **Newman, H.R.** The mineral industry of Spain 2002. *U.S. Geological Survey Minerals Yearbook*. Area Reports: International, 2002, Vol. III.
5. **Gray, J.E., Hines, M.E., Higuera, P.L., Adatto, I., Lasorsa, B.K.** Mercury speciation and microbial transformations in mine waters, stream sediments and surface waters at the Almadén mining district, Spain. *Environmental Science and Technology*. 2004, Vol. 38, p. 4285-4292.
6. **Figueres, G., Martin, J.M., Maybeck, M., Seyler, P.** A comparative study of mercury contamination in the Tagus estuary (Portugal) and major French estuaries (Gironde, Loire, Rhone). *Estuarine Coastal Shelf Science*. 1985, Vol. 20, p. 183-203.
7. **Puche, O.** *Mecanismos estructurales del volcanismo paleozoico en la región alcudiense*. Tesis Doctoral: Universidad Politécnica de Madrid, 1989.
8. **Higuera, P.** *Procesos petrogenéticos y de alteración de las rocas magmáticas asociadas a las mineralizaciones de mercurio del distrito de Almadén*. Tesis Doctoral: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Castilla-La Mancha, 1995.
9. **Hernández, A.M.** *Las minas de Almadén*. Madrid: Ed. Minas de Almadén y Arrayanes, S.A., 1995.
10. **Hildebrand, S.G., Huckabee, J.W., Sanz Díaz, F., Janzen, S.A., Solomon, J.A., Kumar, K.D.** Distribution of mercury in the environment at Almadén, Spain (ORNL/TM-7446). *Oak Ridge National Laboratory*. Oak Ridge, TN. 1980.

11. Lindberg, S.E., Jackson, D.R., Huckabee, J.W., Janzen, S.A., Levin, M.J., Lund, J.R. Atmospheric emission and plant uptake of mercury from agricultural soils near the Almadén mercury mine. *Environmental Quality*. 1979, Vol. 8, p. 572-578.
12. Huckabee, J.W., Sanz Díaz, F., Janzen, S.A., Solomon, J. Distribution of mercury in vegetation at Almadén, Spain. *Environmental Pollution (Series A)*. 1983, Vol. 30, p. 211-224.
13. Ferrara, R., Maserti, B.E., Andersson, M., Edner, H., Ragnarson, P., Svanberg, S., Hernández, A. Atmospheric mercury concentrations and fluxes in the Almadén district (Spain). *Atmospheric Environment*. 1998, Vol. 32, p. 3897-3904.
14. Rodríguez Martín-Doimeadios, R.C., Wasserman, J.C., García Bermejo, L.F., Amouroux, D., Berzas Nevado, J.J., Donard, O.F.X. Chemical availability of mercury in stream sediments from the Almadén area, Spain. *Journal of Environmental Monitoring*. 2000, Vol. 2, p. 360-366.
15. Berzas Nevado, J.J., García Bermejo, L.F., Rodríguez Martín-Doimeadios, R.C. Distribution of mercury in the aquatic environment at Almadén, Spain. *Environmental Pollution*. 2003, Vol. 122, p. 261-271.
16. Bernaus, A., Gaona, X., Esbri, J.M., Higuera, P., Falkenberg, G., Valiente, M. Microprobe techniques for speciation analysis and geochemical characterization of mine environments: the mercury district of Almadén in Spain. *Environmental Science and Technology*. 2006, Vol. 40, p. 4090-4095.
17. Higuera, P., Oyarzun, R., Lillo, J., Sánchez-Hernández, J.C., Molina, J.A., Esbrí, J.M., Lorenzo, S. The Almadén district (Spain): Anatomy of one of the world's largest Hg-contaminated sites. *Science of the Total Environment*. 2006, Vol. 356, p. 112-124.
18. Higuera, P., Oyarzun, R., Biester, H., Lillo, J., Lorenzo, S. A first insight into mercury distribution and speciation in soils from the Almadén mining district, Spain. *Journal of Geochemical Exploration*. 2003, Vol. 80, p. 95-104.
19. Moreno-Jiménez, E., Gamarra, R., Carpena-Ruiz, R.O., Millán, R., Peñalosa, J.M., Esteban, E. Mercury bioaccumulation and phytotoxicity in two wild plant species of Almadén area. *Chemosphere*. 2006, Vol. 63, p. 1969-1973.
20. Millán, R., Gamarra, R., Schmid, T., Sierra, M.J., Quejido, A.J., Sánchez, D.M., Cardona, A.I., Fernández, M., Vera, R. Mercury content in vegetation and soils of the Almadén mining area (Spain). *Science of the Total Environment*. 2006, Vol. 368, p. 79-87.

21. **Jackson, T.A.** The mercury problem in recently formed reservoirs of Northern Manitoba (Canadá): Effects of impoundment and other factors on the production of methylmercury by microorganisms in sediments. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 1988, Vol. 45, p. 97-121.
22. **Gebhards, S., Cline, J., Shields, F., Pearson, L.** Mercury residues in Idaho fishes. *Idaho Academy Science Spectrometry Research*. 1971, Vol. 2, p. 44-48.
23. **Potter, L., Kidd, D., Standiford, D.** Mercury levels in Lake Powell. *Environmental Science and Technology*. 1975, Vol. 9, p. 41-46.
24. **Aberbathy, A.R., Cumbie, P.M.** Mercury accumulation by large mouth bass (*Micropterus salmoides*) in recently impounded reservoirs. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 1977, Vol. 17, p. 595-602.
25. **Bruce, W.J., Spencer, K.D.** Mercury levels in Labrador fish, 1977-78. *Canadian Industry Report of Fisheries and Aquatic Sciences*. 1979, Vol. 111.
26. **Cox, J.A., Carnahan, J., Di Nunzio, J., McCoy, J., Meister, J.** Sources of mercury in fish in new impoundments. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 1979, Vol. 23, p. 779-783.
27. **Meister, J.F., Di Nunzio, J., Cox, J.A.** Source and level of mercury in a new impoundment. *Journal of the American Water Works Association*. 1979, Vol. 71, p. 574-576.
28. **McGregor, G.W.G.** Summary of mercury levels in lakes on the Churchill-Rat-Burntwood, and Nelson River systems from 1970 to 1979. *Canadian Data Report of Fisheries and Aquatic Science*. 1980, Vol. 195.
29. **Waite, D.T., Duwn, G.W., Stedwill, R.J.** Mercury in Cookson Reservoir (East Poplar River). *Report of Water Pollution Branch, Saskatchewan Environment, Government of Saskatchewan (Canada)*. 1980.
30. **Bodaly, R.A., Hecky, R.E., Fudge, R.J.P.** Increases in fish mercury levels in lakes flooded by the Churchill River diversion, northern Manitoba. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 1984, Vol. 41, p. 682-691.
31. **Bodaly, R.A., St. Louis, V.L., Paterson, M.J., Fudge, R.J.P., Hall, B.D., Rosenberg, D.M., Rudd, J.W.M.** Bioaccumulation of mercury in the aquatic food chain in newly flooded areas. A. Sigel y H. Sigel. *Metal Ions in Biological Systems*. New York: Marcel Decker, Inc., 1997, Vol. 34, p. 259-287.

32. Hecky, R.E., Ramsey, D.J., Bodaly, R.A., Strange, N.E. Increased methylmercury contamination in fish in newly formed freshwater reservoirs. *Advances in Mercury Toxicology*. 1991, p. 33-52.
33. Brigham, M.E., Krabbenhoft, D.P., Olson, M.L., Dewild, J.F. Methylmercury in flood-control impoundments and natural waters of northwestern Minnesota, 1997-99. *Water, Air and Soil Pollution*. 2002, Vol. 138, p. 61-78.
34. Jackson, T.A. Speciation, mobilization and biological accumulation of mercury in recently formed reservoirs of northern Manitoba (abstract). International Association for Great Lakes Research. *27th Conference on Great Lakes Research*. Ontario. 1984, p. 45.
35. Jackson, T.A. Methylation, demethylation and bio-accumulation of mercury in lakes and reservoirs of northern Manitoba, with particular reference to effects of environmental changes caused by the Churchill-Nelson River diversion. *Summary Report, Canada-Manitoba agreement on the study and monitoring of mercury in the Churchill river diversion*. Governments of Canada and Manitoba, 1987.
36. Hecky, R.E., Bodaly, R.A., Strange, N.E., Ramsey, D.J., Anema, C., Fudge, R.J.P. Mercury bioaccumulation in yellow perch in linocorrals simulating the effects of reservoir formation. *Summary Report, Canada-Manitoba agreement on the study and monitoring of mercury in the Churchill river diversion*. Governments of Canada and Manitoba.
37. Kelly, C.A., Rudd, J.W.M., Bodaly, R.A., Roulet, N.P., St. Louis, V.L., Heyes, A., Moore, T.R., Schiff, S., Aravena, R., Scott, K.J., Dyck, B., Harris, R., Warner, B., Edwards, G. Increases of fluxes of greenhouse gases and methylmercury following flooding of an experimental reservoir. *Environmental Science and Technology*. 1997, Vol. 31, p. 1334-1344.
38. Gilmour, C.C., Henry, E.A., Mitchell, R. Sulfate stimulation of mercury methylation in freshwater sediments. *Environmental Science and Technology*. 1992, Vol. 26, p. 2281-2287.
39. Compeau, G.C., Bartha, R. Sulfate-reducing bacteria-principal methylators of mercury in anoxic estuarine sediment. *Applied and Environmental Microbiology*. 1985, Vol. 50, p. 498-502.
40. Heyes, A., Moore, T.R., Rudd, J.W.M. Mercury and methylmercury in decomposing vegetation of a pristine and impounded wetland. *Journal of Environmental Quality*. 1998, Vol. 27, p. 591-599.

41. French, K.J., Anderson, M.R., Scruton, D.A., Ledrew, L.J. Fish mercury levels in relation to characteristics of hydroelectric reservoirs in Newfoundland, Canada. *Biogeochemistry*. 1998, Vol. 40, p. 217-233.
42. Jin, L., Hui, Y., Xu, X. Predictive model for mercury accumulation in carp (*Cyprinus carpio*) of reservoirs in China. *Water, Air and Soil Pollution*. 1999, Vol. 115, p. 363-370.
43. Tseng, C M., Amouroux, D., Abril, G., Tessier, E., Etcheber, H. and Donard, O.F.X. Speciation of mercury in a fluid mud profile of a highly turbid macrotidal estuary (Gironde, Francia). *Environmental Science and Technology*. 2001, Vol. 35, p. 2627-2633.
44. Coquery, M., Cossa, D., Sanjuan, J. Speciation and sorption of mercury in two macro-tidal estuaries. *Marine Chemistry*. 1997, Vol. 58, p. 213-227.
45. Gray, J.E., Theodorakos, P.M., Bailey, E.A., Turner, R.R. Distribution, speciation and transport of mercury in stream-sediment, stream-water and fish collected near abandoned mercury mines in southwestern Alaska, USA. *Science of the Total Environment*. 2000, Vol. 260, p. 21-33.
46. Conaway, C.H., Squire, S., Mason, R.P., Flegal, A.R. Mercury speciation in the San Francisco Bay estuary. *Marine Chemistry*. 2003, Vol. 80, p. 199-225.
47. Ramalhosa, E., Río Segade, S., Pereira, E., Vale, C., Duarte, A. Mercury cycling between the water column and surface sediments in a contaminated area. *Water Research*. 2006, Vol. 40, p. 2893-2900.
48. Ganguli, P.M., Mason, R.P., Abu-Saba, K.E., Anderson, R.S., Flegal, A.R. Mercury speciation in drainage from the New Idria mercury mine, California. *Environmental Science and Technology*. 2000, Vol. 34, p. 4773-4779.
49. United States Environmental Protection Agency. Water quality standards, establishment of numeric criteria for priority toxic pollutants, state's compliance, final rule. *Federal Register*. 1992, Vol. 57, 400 CFR Part 131, p. 60.847-60.916.
50. WHO (World Health Organization). *International Standards for Drinking Water*. 3rd Edition. Ginebra, 1971.
51. B.O.E. Real Decreto 1138/1990. 14 de septiembre de 1990.
52. Balls, P.W. The partition of trace metals between dissolved and particulate phases in European coastal waters: a compilation of filed data and comparison with laboratory studies. *Netherlands Journal of Sea Research*. 1989, Vol. 23, p. 7-14.

53. **Morel, F.M.M., Gschwend, P.M.** The role of colloids in the partitioning of solutes in natural waters. W. Stumm. *Aquatic surface chemistry*. New York: Ed. John Wiley & Sons, 1987, p. 405-422.
54. **Leermakers, M., Meuleman, C., Baeyens, W.** Mercury distribution and fluxes in Lake Baikal. W., Ebinghaus, R., Vasiliev, O. Baeyens. *Global and regional mercury cycles: sources, fluxes and mass balances*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996, p. 303-315.
55. **Lyons, W.B., Welch, K.A., Bonzongo, J.C.** Mercury in aquatic systems in Antarctica. *Geophysical Research Letters*. 1999, Vol. 26, p. 2235-2238.
56. **Bonzongo, J.C., Heim, K.J., Warwick, J.J., Lyons, W.B.** Mercury levels in surface waters of the Carson River-Lahontan reservoir system, Nevada: Influence of historic mining activities. *Environmental Pollution*. 1996, Vol. 2, p. 193-201.
57. **Quémerais, B., Cossa, D., Rondeau, B., Pham, T.T., Fortin, B.** Mercury distribution in relation to iron and manganese in the waters of the St. Lawrence river. *Science of the Total Environment*. 1998, Vol. 213, p. 193-201.
58. **Balogh, S.J., Meyer, M.L., Johnson, D.K.** Transport of mercury in three contrasting river basins. *Environmental Science and Technology*. 1998, Vol. 32, p. 456-462.
59. **Wayne, D.M., Warwick, J.J., Lechler, P.J., Gill, G.A., Lyons, W.B.** Mercury contamination in the Carson River, Nevada: a preliminary study of the impact of mining wastes. *Water, Air and Soil Pollution*. 1996, Vol. 92, p. 391-408.
60. **Ogrinc, N., Monperrus, M., Kotnik, J., Fajon, V., Vidimova, K., Amouroux, D., Kocman, D., Tessier, E., Zizek, S., Horvat, M.** Distribution of mercury and methylmercury in deep-sea surficial sediments of the Mediterranean Sea. *Marine Chemistry*. 2007, Vol. 107, p. 31-48.
61. **Canario, J., Vale, C., Caetano, M.** Distribution of monomethylmercury and mercury in surface sediments of the Tagus Estuary (Portugal). *Marine Pollution Bulletin*. 2005, Vol. 50, p. 1121-1145.
62. **Covelli, S., Faganeli, H., Horvat, M., Brambati, A.** Mercury contamination of coastal sediments as the result of long-term cinnabar mining activity (Gulf of Trieste, northern Adriatic Sea). *Applied Geochemistry*. 2001, Vol. 16, p. 541-558.

63. Trefry, J.H., Trocine, R.P., McElvaine, M.L., Rember, R.D. Concentrations of total mercury and methylmercury in sediment adjacent to offshore drilling sites in the Gulf of Mexico. *Final Report to the Synthetic Based Muds (SBM) Research Group*. Florida Institute of Technology, 2002.
64. Lambertsson, L., Nilsson, M. Organic material: the primary control on mercury methylation and ambient methyl mercury concentrations in estuarine sediments. *Environmental Science and Technology*. 2006, Vol. 40, p. 1822-1829.
65. Ullrich, S.M., Tanton, T.W., Abdrashitova, S.A. Mercury in the aquatic environment: a review of factors affecting methylation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 2001, Vol. 31, p. 241-293.
66. Huerta-Diaz, M.A., Morse, J.W. A quantitative method for determination of trace metal concentrations in sedimentary pyrite. *Marine Chemistry*. 1990, Vol. 29, p. 119-144.
67. Matty, J.M., Long, D.T. Early diagenesis of mercury in the Laurentian Great Lakes. *Journal of Great Lakes Research Contents*. 1995, Vol. 21, p. 574-586.
68. Bloom, N.S., Colman, J.A., Capellino, S., Dobbs, C., McShea, L., Driscoll, C., Mason, R., Rudd, J. Speciation and cycling of mercury in Lavaca Bay, Texas, sediments. *Environmental Science and Technology*. 1999, Vol. 33, p. 7-13.
69. Bloom, N.S., Preus, E., Katon, J., Hiltner, M. Selective extractions to assess the biogeochemically relevant fractionation of inorganic mercury in sediments and soils. *Analytica Chimica Acta*. 2003, Vol. 479, p. 233-248.
70. Hammerschmidt, C.R., Fitzgerald, W.F., Lamborg, C.H., Balcom, P.H., Visscher, P.T. Biogeochemistry of methylmercury in sediments of Long Island Sound. *Marine Chemistry*. 2004, Vol. 90, p. 31-52.
71. Hylander, L.D., Meili, M., Oliveira, L.J., De Castro e Silva, E., Guimaraes, J.R.D., Araujo, D.M., Neves, R.P., Stachiw, R., Barros, A.J.P., Silva, G.D. Relationship of mercury with aluminium, iron and manganese oxy-hydroxides in sediments from the Alto Pantanal, Brazil. *Science of the Total Environment*. 2000, Vol. 260, p. 97-107.
72. Hammerschmidt, C.R., Fitzgerald, W.F. Geochemical controls on the production and distribution of methylmercury in near-shore marine sediments. *Environmental Science and Technology*. 2004, Vol. 38, p. 1487-1495.
73. Sunderland, E.M., Gobas, F.A.P.C., Branfireun, B.A., Heyes, A. Environmental controls on the speciation and distribution of mercury in coastal sediments. *Marine Chemistry*. 2006, Vol. 102, p. 111-123.

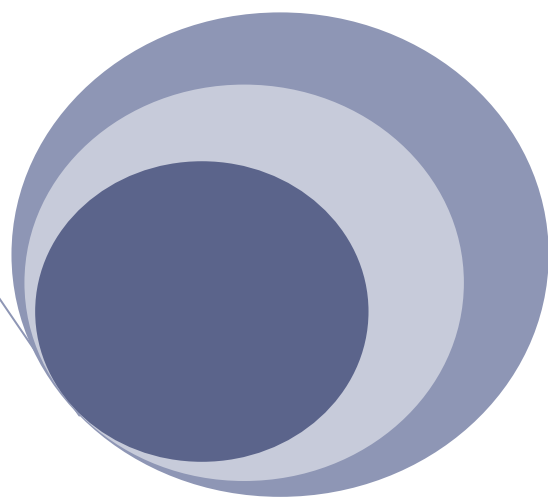
74. **Hammerschmidt, C.R., Fitzgerald, W.F.** Methylmercury cycling in sediments on the continental shelf of southern New England. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 2006, Vol. 70, p. 918-930.
75. **Shi, J., Liang, L., Jiang, G., Jin, X.** The speciation and bioavailability of mercury in sediments of Haihe River, China. *Environment International*. 2005, Vol. 31, p. 357-365.
76. **Gochfeld, M.** Cases of mercury exposure, bioavailability and absorption. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2003, Vol. 56, p. 174-179.
77. **Cizdziel, J., Hinnert, T., Cross, C., Pollard, J.** Distribution of mercury in the tissues of five species of freshwater fish from Lake Mead, USA. *Journal of Environmental Monitoring*. 2003, Vol. 5, p. 802-807.
78. **Bloom, N.S.** On the chemical form of mercury in edible fish and marine invertebrate tissue. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 1992, Vol. 49, p. 1010-1017.
79. **Inskip, M.J., Piotrowski, J.K.** Review of the health effects of methylmercury. *Journal of Applied Toxicology*. 1985, Vol. 5, p. 113-133.
80. **WHO (World Health Organization), ICPS (International Program on Chemical Safety).** Methylmercury. *Environmental Health Criteria 101*. Ginebra: World Health Organization, 1990.
81. **Eisler, R.** Mercury hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. *U.S. Fish and Wildlife Service Biological Report*. 1987, Vol. 85, 1.10.
82. **Tchounwou, P.B., Ayensu, W.K., Ninashvili, N., Sutton, D.** Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health. *Environmental Toxicology*. 2003, Vol. 18, p. 149-175.
83. **Seixas, S., Bustamante, P., Pierce, G.** Accumulation of mercury in the tissues of the common octopus *Octopus vulgaris* (L.) in two localities on the Portuguese coast. *Science of the Total Environment*. 2005, Vol. 340, p. 113-120.
84. **Castilhos, Z.C., Rodrigues-Filho, S., Rodrigues, A.P., Villas-Bôas, R.C., Veiga, M.M., Beinhoff, C.** Biomagnification of mercury in fish from gold mining affected Amazonian aquatic systems. *7th International Conference on Mercury as a Global Pollutant*. Rio de Janeiro, 2004.

85. **Belger, L., Forsberg, B.R.** Factors controlling Hg levels in two predatory fish species in the Negro river basin, Brazilian Amazon. *Science of the Total Environment*. 2006, Vol. 367, p. 451-459.
86. **Boudou, A., Maury-Brachet, R., Coquery, M., Durrieu, G., Cossa, D.** Synergic effect of gold mining and damming on mercury contamination in fish. *Environmental Science and Technology*. 2005, Vol. 39, p. 2448-2454.
87. **Cabañero, A.I., Madrid, Y., Cámara, C.** Selenium and mercury bioaccessibility in fish samples: an in vitro digestion method. *Analytica Chimica Acta*. 2004, Vol. 526, p. 51-61.
88. **Storelli, M.M., Storelli, A., Giacomini-Stuffler, R., Marcotrigiano, G.O.** Mercury speciation in muscle of two commercially important fish, hake (*Merluccius merluccius*) and striped mullet (*Mullus barbatus*) from the Mediterranean sea: estimated weekly intake. *Food Chemistry*. 2005, Vol. 89, p. 295-300.
89. **Svobodová, Z., Dusek, L., Hehtmánek, M., Vykusová, B., Smíd, R.** Bioaccumulation of mercury in various fish species from Orlík and Kamýk water reservoirs in the Czech Republic. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 1999, Vol. 43, p. 231-240.
90. **Cizdziel, J.V., Hinnert, T.A., Pollard, J.E., Heithmar, E.M., Cross, C.L.** Mercury concentrations in fish from Lake Mead, USA, related to fish size, condition, trophic level, location, and consumption risk. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2002, Vol. 43, p. 309-317.
91. **Paterson, M.J., Rudd, J.W.M., St. Louis, V.** Increases in total and methylmercury in zooplankton following flooding of a peatland reservoir. *Environmental Science and Technology*. 1998, Vol. 32, p. 3868-3874.
92. **European Economic Community.** Objectif de qualité rejets industriels. *Conseil des Ministres*. L74/49, 1984.
93. **United States Food and Drug Administration.** Action level for mercury in fish, shellfish, crustaceans and other aquatic animals. *Comment from the Department of Health, Education and Welfare, Food and Drug Administration*. 1979, Vol. 44, p. 3990-3993.
94. **Nguyen, H.L., Leermakers, M., Kurunczi, S., Bozo, L., Baeyens, W.** Mercury distribution and speciation in Lake Balaton, Hungary. *Science of the Total Environment*. 2005, Vol. 340, p. 231-246.

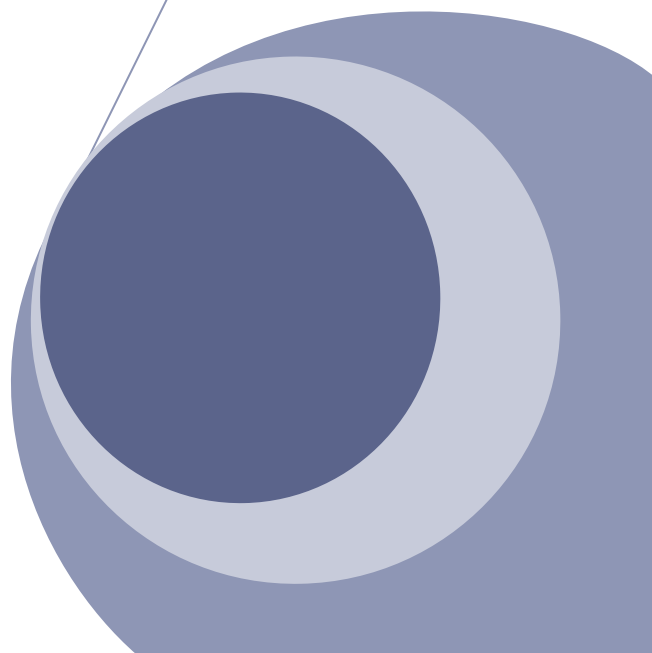
95. **Watras, C.J., Bloom, N.S., Fitzgerald, W.F., Weiner, J.G., Rada, R., Hudson, R.M.J., Gherini, S.A., Porcella, D.B.** Sources and fates of mercury in remote temperature lakes. C.J. Watras y J.W. Huckabee. *Mercury as a global pollutant*. Boca Raton: Ed. Lewis Publishers, 1994, p. 153-180.
96. **Gill, G.A., Bruland, K.W.** Mercury speciation in surface freshwater systems in California and other areas. *Environmental Science and Technology*. 1990, Vol. 24, p. 1392-1400.
97. **Gustin, M.S., Taylor, G.E., Leonard, T.D.** High levels of mercury contamination in multiple media of the Carson River Drainage Basin of Nevada: Implications for risk assessment. *Environmental Health Perspectives*. 1994, Vol. 102, p. 772-778.
98. **Chen, Y., Bonzongo, J.C., Miller, G.C.** Levels of methyl mercury in surface sediments of the Carson River system and controlling factors. *Environmental Pollution*. 1996, Vol. 92, p. 391-408.
99. **Bonzongo, J.C., Heim, K.J., Chen, Y., Lyons, W.B., Warwick, J.J., Miller, G., Lechler, P.J.** Mercury pathways in the Carson River - Lahontan Reservoir system, Nevada, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 1996, Vol. 15, p. 677-683.
100. **Gray, J.E., Crock, J.G., Fey, D.L.** Environmental geochemistry of abandoned mercury mines in West-Central Nevada, USA. *Applied Geochemistry*. 2002, Vol. 17, p. 1069-1079.
101. **Gray, J.E., Theodorakos, P.M., Budahn, J., O'Leary, R.** Mercury in the environment and its implications, Kuskokwin River region, southwestern Alaska. *U.S. Geological Survey Bulletin*. 1994, Vol. 2107, p. 3-13.
102. **Gray, J.E., Meier, A.L., O'Leary, R.M., Outwater, C., Theodorakos, P.M.** Environmental geochemistry of mercury deposits in southwestern Alaska: mercury contents in fish, stream-sediment, and stream-water samples. *U.S. Geological Survey Bulletin*. 1996, Vol. 2152, p. 17-29.
103. **Bailey, E.A., Gray, J.E.** Mercury in the terrestrial environment, Kuskokwim Mountains Region, Southwestern Alaska. *U.S. Geological Survey Bulletin*. 1997, p. 41-56.
104. **Rytuba, J.J.** Mercury mine drainage and processes that control its environmental impact. *Science of the Total Environment*. 2000, Vol. 260, p. 57-71.

105. Hines, M.E., Horvat, M., Faganeli, J., Bonzongo, J.J., Barkay, T., Major, E.B., Scott, K.J., Bailey, E.A., Warwick, J.J., Lyons, W.B. Mercury biogeochemistry in the Idrija River, Slovenia, from above the mine into the Gulf of Trieste. *Environmental Research*. 2000, Vol. Section A 83, p. 129-139.
106. Gosar, M., Pirc, S., Bidovec, M. Mercury in the Idrijca River sediments as a reflection of mining and smelting activities of the Idrija mercury mine. *Journal of Geochemical Exploration*. 1997, Vol. 58, p. 125-131.
107. Gray, J.E. An overview of mercury transport, cycling and environmental effects of mercury mining. *Materials and Geoenvironment*. 2001, Vol. 48, p. 2-7.
108. Ferrara, R., Maserti, B.E., Breder, R. Mercury in abiotic and biotic compartments of an area affected by a geochemical anomaly (Mt. Amiata, Italy). *Water, Air and Soil Pollution*. 1991, Vol. 56, p. 219-233.
109. Ferrara, R., Maserti, B.E., Andersson, M., Edner, H., Ragnarson, P., Svanberg, S. Mercury degassing rate from mineralized areas in the Mediterranean basin. *Water, Air and Soil Pollution*. 1997, Vol. 93, p. 59-66.
110. Barghiagiani, C., Ristori, T. The distribution of mercury in a Mediterranean area. C.J. Watras y J.W. Huckabee. *Mercury Pollution: Integration and Synthesis*. Boca Raton: Ed. Lewis Publishers, 1992, p. 41-49.
111. Donkor, A.K., Bonzongo, J.C., Nartey, V.K., Adotey, D.K. Mercury in different environmental compartments of the Pra River Basin, Ghana. *Science of the Total Environment*. 2006, Vol. 368, p. 164-176.
112. Jenne, E.A. Atmospheric and fluvial transport of mercury, from: Mercury in the environment. *U.S. Geological Survey Professional Paper 713*. 1970, p. 40-45.
113. Miskimmin, B.M., Rudd, J.W.M., Kelly, C.A. Influence of dissolved organic carbon, pH and microbial respiration rates on the mercury methylation and demethylation in lake water. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 1992, Vol. 49, p. 17-22.
114. Hern, J.D. Chemical behaviour of mercury in aqueous media, from: Mercury in the environment. *U.S. Geological Survey Professional paper 713*. 1970, p. 19-24.
115. Miller, J.R., Lechler, P.J., Rowland, J., Desilets, M., Hsu, L.C. An integrated approach to the determination of the quantity, distribution and dispersal of mercury in Lahontan Reservoir, Nevada, USA. *Journal of Geochemical Exploration*. 1995, Vol. 52, p. 45-55.

116. Suchanek, T.H., Mullen, L.H., Lamphere, B.A., Richerson, P.J., Woodmansee, C.E., Slotton, D.G., Harner, E.J., Woodward, L.A. Redistribution of mercury from contaminated lake sediments of Clear Lake, California. *Water, Air and Soil Pollution*. 1998, Vol. 104, p. 77-102.
117. Williams, T.M., Weeks, J.M., Apostol Jr., A.N., Miranda, C.R. Assessment of mercury contamination and human exposure associated with coastal disposal of waste from a cinnabar mining operation, Palawan, Philippines. *Environmental Geology*. 1999, Vol. 39, p. 51-60.
118. Castilhos, Z.C., Rodrigues-Filho, S., Rodrigues, A.P.C., Villas-Bôas, R.C., Siegel, S., Veiga, M.M., Beinhoff, C. Mercury contamination in fish from gold mining areas in Indonesia and human health risk assessment. *Science of the Total Environment*. 2006, Vol. 368, p. 320-325.
119. Maury-Brachet, R., Durrieu, G., Dominique, Y., Boudou, A. Mercury distribution in fish organs and food regimes: significant relationships from twelve species collected in French Guiana (Amazonian basin). *Science of the Total Environment*. 2006, Vol. 368, p. 262-270.
120. Horvat, M., Covelli, S., Faganelli, J., Logar, M., Mandic, V., Rajar, R., Sirca, A., Zagar, D. Mercury in contaminated coastal environments - a case study: the Gulf of Trieste. *Science of the Total Environment*. 1999, Vol. 237/238, p. 43-56.
121. Back, R.C., Watras, C.J. Mercury in zooplankton of northern Wisconsin lakes-taxonomic and site-specific trends. *Water, Air and Soil Pollution*. 1995, Vol. 80, p. 931-938.
122. Westcott, K., Kalff, J. Environmental factors affecting methylmercury accumulation in zooplankton. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 1996, Vol. 53, p. 2221-2228.



Conclusiones finales



CONCLUSIONES FINALES

1. Se han desarrollado métodos analíticos sencillos, rápidos y reproducibles para la determinación de contenidos totales de mercurio en aguas, sedimentos y muestras biológicas de origen animal y vegetal basados en el análisis mediante un sistema de inyección en flujo, con generación de vapor frío y determinación por espectroscopia de fluorescencia atómica (FI-CV-AFS) y la extracción en horno microondas con recipientes cerrados. Estos métodos fueron validados utilizando materiales de referencia certificados para sedimentos (GBW 07310 y GBW 07311), tejidos biológicos de origen animal (TORT-1, GBW 08571, DOLT-3 y DORM-2) y plantas acuáticas (BCR 60), obteniéndose en todos los casos valores que no presentan diferencias estadísticamente significativas con los valores certificados.
2. Se ha desarrollado un procedimiento simple, rápido y preciso para la especiación indirecta de mercurio orgánico en tejidos de peces determinando específicamente el mercurio inorgánico presente en estas muestras por FI-CV-AFS. Para optimizar las condiciones de extracción por microondas en recipientes cerrados se aplicó un diseño factorial de experimentos donde se comprobó que las condiciones óptimas eran el empleo de 2 mL de hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) como agente extractante y la aplicación de una temperatura máxima de 180 °C. La validación del método propuesto se realizó utilizando materiales de referencia certificados, como el DOLT-3 y el DORM-2, obteniendo resultados que no se diferencian estadísticamente con los valores certificados al nivel de significación escogido ($p=0,05$).
3. Se ha desarrollado y puesto a punto un sistema híbrido para la especiación de mercurio compuesto por un cromatógrafo de gases acoplado a un detector fluorescencia atómica a través de la pirólisis térmica (GC-pyro-AFS). La optimización del acoplamiento instrumental se llevó a cabo tratando de minimizar los límites de detección así como

el tiempo necesario para la determinación selectiva de las especies de mercurio. En las condiciones óptimas se obtuvo buena resolución en los cromatogramas obtenidos y unos límites de detección de 2 pg para el monometilmercurio (como Hg) y 1 pg para el mercurio inorgánico. La etapa de derivatización previa requerida para la determinación de las especies por cromatografía de gases se llevó a cabo utilizando como reactivo tetraetilborato de sodio.

4. Se ha puesto a punto un procedimiento para la especiación de mercurio en muestras biológicas por GC-pyro-AFS basado en una extracción previa de las muestras por microondas en recipientes cerrados usando hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) como agente extractante y una posterior derivatización de las muestras con tetraetilborato de sodio. Este método fue validado empleando los materiales de referencia certificados DOLT-3 y DORM-2 obteniéndose resultados que no presentaban diferencias estadísticamente significativas con los valores certificados en el intervalo de confianza seleccionado (95 %). Además se estudiaron las recuperaciones de los contenidos adicionados sobre tejido muscular de pez que fueron próximas al 100 % en todos los casos.
5. Se ha establecido una estrategia general para la determinación de monometilmercurio en todo tipo de sedimentos utilizando el sistema híbrido desarrollado. Para ello, las muestras se sometieron, en primer lugar, a una extracción ácida con HNO_3 6 M por calentamiento en horno microondas con recipientes cerrados. Además, debido a los bajos niveles de monometilmercurio en presencia generalmente de altos contenidos de mercurio inorgánico, fue necesario incluir etapas de preconcentración y limpieza, para llegar a límites de detección adecuados así como evitar la generación artificial de monometilmercurio. Asimismo se comprobó que la mayor parte de las posibles interferencias eran ocasionadas por la fracción de mercurio inorgánico co-extraído con el monometilmercurio por lo que se evaluó el papel desempeñado por dicha fracción en la generación artificial de monometilmercurio. Por tanto, para aquellas muestras con contenidos

altos de mercurio inorgánico (concentración de mercurio inorgánico extraíble superior a 500 ng g^{-1}) se puso a punto un método de limpieza y aislamiento selectivo del monometilmercurio mediante una extracción con diclorometano en medio ácido clorhídrico. Mientras que para aquellos sedimentos poco contaminados con bajos contenidos en monometilmercurio fue necesario aplicar un método de preconcentración por evaporación utilizando una corriente de nitrógeno. La validación de estos métodos se realizó utilizando materiales de referencia certificados, como el ERM-CC-580 y el IAEA-405 (ambos sedimentos de estuario), obteniéndose valores que no presentaban diferencias estadísticamente significativas con los valores certificados en el intervalo de confianza estudiado (95 %).

6. Se ha desarrollado un método para la determinación simultánea de monometilmercurio y mono-, di- y tributilestaño (CH_3Hg^+ , MBT, DBT y TBT) por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (GC-MS) en diferentes tipos de muestras medioambientales usando un procedimiento común para la preparación de la muestra. La metodología se basó en el análisis por dilución isotópica específica lo que permitió conseguir una mayor exactitud y precisión en los resultados. No obstante, para obtener relaciones isotópicas lo más precisas y exactas posibles, se optimizaron parámetros como el tiempo de integración o la energía de ionización. Los distintos procedimientos de preparación de la muestra propuestos fueron validados, en primer lugar, analizando materiales de referencia certificados para los compuestos butilados de estaño (CRM-477 (tejido de mejillón) y SOPH-1 (sedimento marino)) y para el monometilmercurio (CRM-464 (tejido de atún)). Asimismo, la determinación simultánea de las cuatro especies de interés fue validada por obtención de recuperaciones cuantitativas en aguas naturales fortificadas y analizando el material de referencia BCR-710 (certificado para tributilestaño y monometilmercurio), obteniéndose valores acordes no sólo a los valores certificados sino también a los propuestos para mono- y dibutilestaño.

7. Se ha estudiado por primera vez la especiación y distribución del mercurio en el sistema constituido por el río Valdezogues y el embalse de La Serena analizando muestras de aguas, sedimentos y biota tomadas durante los años 2005 y 2006. Las concentraciones de mercurio disuelto en las aguas fueron, en general, inferiores a $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$. Sin embargo, los contenidos en mercurio particulado fueron más altos al oscilar entre $0,1$ - $87 \mu\text{g g}^{-1}$, presentando estos valores una importante variación estacional. En los sedimentos del río, las concentraciones de mercurio total oscilaron entre 7 y $74 \mu\text{g g}^{-1}$ mientras que en el embalse de La Serena no superaron los $2 \mu\text{g g}^{-1}$. En cuanto al monometilmercurio, las concentraciones máximas encontradas en el embalse fueron de $0,3 \text{ ng L}^{-1}$ en las aguas y 6 ng g^{-1} en los sedimentos mientras que en el río Valdezogues fueron de 5 ng L^{-1} y 880 ng g^{-1} , en aguas y sedimentos, respectivamente. Por su parte, las concentraciones de mercurio total en la biota fueron muy bajas (4 - 43 ng g^{-1} en los peces del río Valdezogues y 38 - 444 ng g^{-1} en los bivalvos del embalse de La Serena). No obstante, en los peces la mayor parte de las concentraciones se encontraba en forma de monometilmercurio (entre el 76 y el 99%) mientras que en los bivalvos este porcentaje osciló entre el 10 - 45% . Los valores obtenidos fueron comparados con los niveles de fondo de la zona y con otras zonas expuestas al mercurio y afectadas por actividades mineras observándose que si bien las muestras tomadas del río Valdezogues rebasan, en general, los niveles de fondo de la zona no alcanzan los altos niveles de contaminación por mercurio encontrados en otras zonas afectadas por la misma problemática. Por otro lado, aunque los resultados correspondientes a las muestras del embalse de La Serena no nos permiten afirmar que la creación del embalse de La Serena haya modificado considerablemente los niveles de monometilmercurio en los terrenos recientemente inundados sí muestran una cierta tendencia a la bioacumulación de dicha especie a través de la cadena trófica por lo que sería necesario continuar este estudio en el tiempo y extenderlo a otras muestras biológicas tomadas también en dicho embalse.

FINAL CONCLUSIONS

1. Analytical methods for the determination of total mercury contents in different types of environmental samples such as waters, sediments, plants and biological tissues using flow injection-cold vapour-atomic fluorescence detection (FI-CV-AFS) and closed-vessel microwave-assisted extraction have been developed. These methods were validated by the analysis of certified reference materials corresponding to sediments (GBW 07310 and GBW 07311), biological tissues (TORT-1, GBW 08571, DOLT-3 and DORM-2) and aquatic plants (BCR 60). An excellent agreement was found between the measured and certified values for total mercury.
2. A simple, rapid and precise indirect mercury speciation procedure applied to fish samples and based on the extraction of mercury species using a closed-vessel microwave-system and selective determination by FI-CV-AFS has been developed. A careful optimisation of the conditions for the microwave extraction procedure was carried out for DOLT-3 and DORM-2 reference materials using an experimental design. The optimal extraction conditions were 2 mL of tetramethylammonium hydroxide (TMAH) as extractant and 180 °C as maximum temperature of irradiation. The inorganic and organic mercury concentrations found were in good agreement with the certified values.
3. An instrumental set-up for the analysis of mercury species was developed combining capillary gas chromatography and atomic fluorescence spectrometry detection through a home-made pyrolysis unit (GC-pyro-AFS). The coupling was optimised with the aim of minimizing the detection limits and time necessary for the species-selective determination of mercury compounds. Working under the optimal operating conditions, it was possible to obtain precise determinations with detection limits of 2 pg for monomethylmercury (as Hg) and 1 pg for inorganic mercury. The derivatization step required for

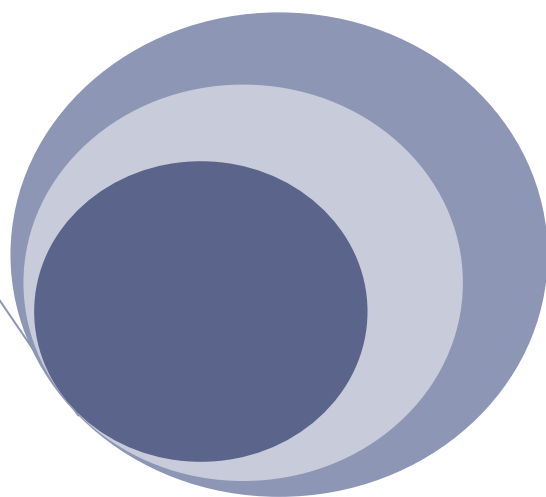
the determination of mercury species by gas chromatography was carried out using sodium tetraethylborate.

4. A simple and rapid method for speciation analysis of inorganic mercury and monomethylmercury in biological tissues has been carried out. The procedure is based on the quantitative closed-vessel microwave-assisted leaching of mercury from biological samples with an alkaline extractant such as methanolic tetramethylammonium hydroxide (TMAH). The extracted mercury species were ethylated and analysed by capillary gas chromatography coupled to an atomic fluorescence detector via pyrolysis. The analytical performance of the methodology proposed, was validated by the analysis of DORM-2 and DOLT-3 certified reference materials. The inorganic mercury and monomethylmercury concentrations found were in good agreement with the certified values. Recovery studies of fish muscle tissue spiked with both mercury species were done to check the reliability of the method. In all cases satisfactory recoveries (92-105 %) were obtained.
5. A general strategy for real sediment analysis has been developed and validated for both low- and high- polluted sediments. The procedure was based on closed-vessel microwave extraction, ethylation and analysis by GC-pyro-AFS. When using 6M HNO₃, the most labile inorganic mercury fraction as well as monomethylmercury were extracted from the sediment but there was still some inorganic mercury that remained un-extracted. The role of the labile inorganic fraction on artifact monomethylmercury generation has been evaluated. Preconcentration and cleaning procedures have been developed for each type of sediment to detect low concentrations and to control artifact generation by using spiked natural sediments and certified reference materials. Therefore, for high-polluted sediments (inorganic mercury concentration above 500 ng g⁻¹), a clean-up step with dichloromethane was applied before ethylation, whereas for low content samples, preconcentration under nitrogen stream at room temperature has been optimised. Both steps can be combined if

necessary. Monomethylmercury content in good agreement with the certified value for the reference materials (IAEA-405 and ERM-CC-580) was found.

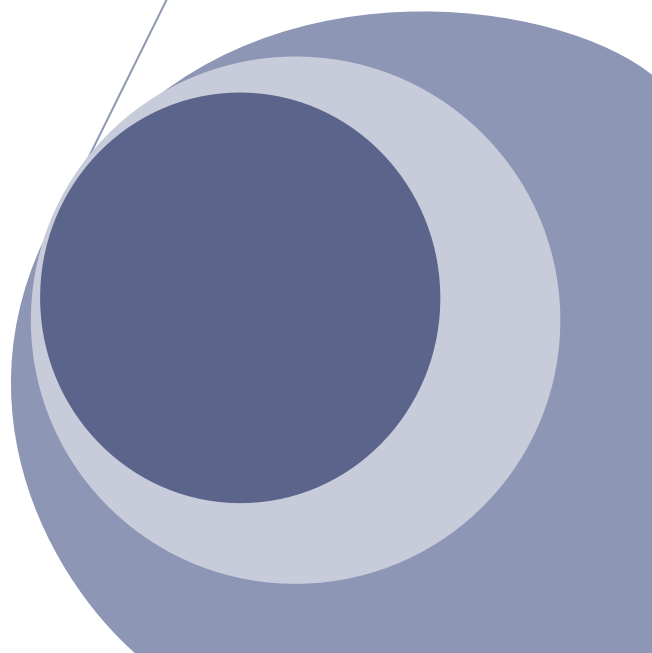
6. A method for the simultaneous determination of monomethylmercury, mono-, di- and tributyltin in environmental samples by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) with electron ionisation using the same sample preparation has been developed. It is based on the use of species-specific isotope dilution analysis which provides a good accuracy and precision. The influence of different parameters such as dwell time and ionisation energy on the measured isotope ratios in each target species was studied. The determination and sample preparation procedures proposed were firstly individually validated by analysing several certified reference materials for butyltin compounds (mussel tissue CRM-477 and marine sediment SOPH-1) and monomethylmercury (tuna fish CRM-464), using an innovative microwave technology for the extraction of species from the solid samples. Additionally, the simultaneous determination of monomethylmercury, mono-, di- and tributyltin was successfully validated by obtaining quantitative recoveries in spiked natural waters and by analysing the certified reference materials BCR-710 (certified in tributyltin and monomethylmercury). The values obtained in such certified materials were fully in agreement, not only with the certified mass fractions, but also with the proposed indicative values for mono- and dibutyltin.
7. Mercury speciation and partitioning have been investigated in the Valdeazogues River-La Serena Reservoir system analyzing water, sediments and biota, sampled in different seasons during a 2-year study (2005-06). Concentrations of dissolved mercury in water were below $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$, whereas particulate mercury ranged from 0.1 to $87 \mu\text{g g}^{-1}$, with remarkable seasonal differences. Total mercury contents between 7 and $74 \mu\text{g g}^{-1}$ were measured in Valdeazogues River, while levels in sediments from La Serena Reservoir were below $2 \mu\text{g g}^{-1}$. On the other

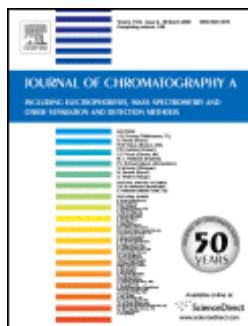
hand, concentrations of monomethylmercury reach values up to 0.3 ng L⁻¹ in waters and 6 ng g⁻¹ in sediments from La Serena Dam, whereas maximum concentrations in Valdezogues River were 5 ng L⁻¹ and 880 ng g⁻¹ in waters and sediments, respectively. However, low total mercury concentrations were found in fish from Valdezogues River (4-43 ng g⁻¹) and bivalves from La Serena Reservoir (38-444 ng g⁻¹). Nevertheless, most of the total mercury in fish was present as monomethylmercury (between 76-99 %) whereas the percentage in bivalves is lower (between 10-45 %). Mercury data obtained were compared with those corresponding to regional background as well as the surveys performed in other mercury mining contaminated areas. These comparisons showed that although samples collected from Valdezogues River are generally up to regional background, its mercury levels did not reach the higher values found in other areas affected by mercury contamination. Furthermore, these results do not make it possible to really know if the construction of La Serena Reservoir has led to an increase in monomethylmercury levels. Nevertheless, there was some evidence of monomethylmercury bioaccumulation along the food web. Therefore, it will be necessary not only to continue this study, but to extend to biological samples collected in this reservoir.



Anexo

Publicaciones relacionadas
con esta tesis

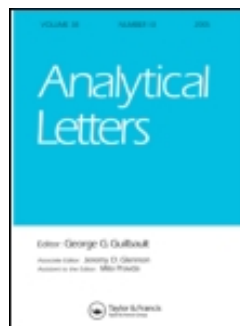




Journal of Chromatography A, 1093 (2005): 21-28

“Determination of mercury species in fish reference materials by gas chromatography-atomic fluorescence detection after closed-vessel microwave assisted-extraction”

Juan José Berzas Nevado, Rosa Carmen Rodríguez Martín-Doimeadios,
Francisco Javier Guzmán Bernardo, María Jiménez Moreno



Analytical Letters, 39 (2006): 2657-2669

**“Indirect mercury speciation in biological tissues by closed-vessel
microwave-assisted digestion and flow-injection cold-vapor
atomic fluorescence detection”**

Juan José Berzas Nevado, Rosa Carmen Rodríguez Martín-Doimeadios,
Francisco Javier Guzmán Bernardo, María Jiménez Moreno



Journal of Mass Spectrometry, 41 (2006): 1491-1497

“Simultaneous determination of monomethylmercury, monobutyltin, dibutyltin and tributyltin in environmental samples by multi-elemental-species-specific isotope dilution analysis using electron ionisation GC-MS”

María Jiménez Moreno, Jaime Pacheco-Arjona, Pablo Rodríguez-González,
Hugues Preud'Homme, David Amouroux, Olivier F.X. Donard



Analytica Chimica Acta, 608 (2008): 30-37

**“Determination of monomethylmercury in low- and high-polluted
sediments by microwave extraction and gas chromatography with
atomic fluorescence detection”**

Juan José Berzas Nevado, Rosa Carmen Rodríguez Martín-Doimeadios,
Francisco Javier Guzmán Bernardo, María Jiménez Moreno



**“Mercury speciation in the Valdezogues River-La Serena Reservoir system:
Influence of Almadén (Spain) historic mining activities”**

Juan José Berzas Nevado, Rosa Carmen Rodríguez Martín-Doimeadios,
María Jiménez Moreno

